

MITTELHOCHDOSIERTE
METHOTREXAT THERAPIE BEI
KINDERN MIT LEUKÄMIE UND
MEDULLOBLASTOM -
PHARMAKOKINETIK, TOXIZITÄT
UND KLINISCHE ERGEBNISSE

Reinhold Mack

*Thess
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554825_0065

AUS DER KINDERKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
IM DR. V. HAUNERSCHEN KINDERSPITAL
DIREKTOR: PROF. DR. H. B. HADORN

MITTELHOCHDOSIERTE METHOTREXAT THERAPIE
BEI KINDERN MIT LEUKÄMIE UND
MEDULLOBLASTOM - PHARMAKOKINETIK,
TOXIZITÄT UND KLINISCHE ERGEBNISSE

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
REINHOLD MACK
AUS
MÜNCHEN
JAHR
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. R. Haas

Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. B. Hadorn

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.1985

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Vorwort

2. Inhaltsverzeichnis

2.1. Inhalt des Buches

2.2. Inhalt des Buches nach Kapiteln

2.3. Inhalt des Buches nach Themen

2.4. Inhalt des Buches nach Autoren

2.5. Inhalt des Buches nach Jahren

2.6. Inhalt des Buches

3. Inhaltsverzeichnis

3.1. Inhaltsverzeichnis des Buches

3.2. Inhaltsverzeichnis des Buches

3.3. Inhaltsverzeichnis

3.4. Inhaltsverzeichnis

3.5. Inhaltsverzeichnis

3.6. Inhaltsverzeichnis

3.7. Inhaltsverzeichnis

3.8. Inhaltsverzeichnis

3.9. Inhaltsverzeichnis

3.10. Inhaltsverzeichnis

3.11. Inhaltsverzeichnis

3.12. Inhaltsverzeichnis

3.13. Inhaltsverzeichnis

3.14. Inhaltsverzeichnis

4. Inhaltsverzeichnis

4.1. Inhaltsverzeichnis

4.2. Inhaltsverzeichnis

4.3. Inhaltsverzeichnis

4.4. Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Grundlagen	5
2.1. Chemie des Methotrexat	5
2.2. Wirkmechanismus des Methotrexat	5
2.3. Metabolisierung und Ausscheidung	8
2.4. Methotrexattoxizität	10
2.5. Aufhebung der Methotrexatwirkung durch Citrovorum-Faktor	10
3. Eigene Untersuchungen	12
3.1. Patienten- und Therapieprotokolle	12
3.1.1. Akute lymphatische Leukämie (ALL)	12
3.1.1.1. Vorbemerkungen	12
3.1.1.2. Protokoll ALL 77-01	13
3.1.1.3. Protokoll ALL 77-02	15
3.1.1.4. Rezidivprotokoll ALL 78	17
3.1.1.5. Protokoll bei ZNS-Rezidiv ALL ZNS-78	18
3.1.2. Medulloblastom - Therapieprotokoll MB 79	18
3.2. Methode und Materialien	20
3.2.1. Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentration	20
3.2.2. Verwendete Materialien	20
3.2.3. Durchführung der Methotrexatbestimmung mit dem Radioimmunoassay	21
3.3. Qualität der Methotrexatbestimmung	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Pharmakokinetik	23
4.1.1. Patienten mit Leukämie in Remission - Blutspiegelbestimmung bei einer Methotrexatdosis von 150 mg/ ²	23

4.1.2.	Patienten mit Leukämie in Remission - Blutspiegelbestimmung bei einer Methotrexatdosis von 500 mg/m ²	23
4.1.3.	Patienten mit Leukämie im Rezidiv	30
4.1.4.	Patienten mit Medulloblastom, Blutspiegelbestimmung	32
4.1.5.	Bestimmung der Liquorspiegel	37
4.1.5.1.	Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie in Remission; Methotrexatdosis 150 mg/m ² und 500 mg/m ²	37
4.1.5.2.	Patienten mit Medulloblastom	37
4.1.6.	Relation der Blut-Liquorspiegel bei Leukämien und Medulloblastom	41
4.1.7.	Vergleich der Pharmakokinetik bei verschiedenen Dosen einer mittelhochdosierten Methotrexattherapie	42
4.2.	Toxizität	42
4.2.1.	Leukämien in Remission	42
4.2.1.1.	Hämatologische Toxizität	42
4.2.1.2.	Hepatotoxizität	44
4.2.1.3.	Nierentoxizität	46
4.2.2.	Leukämien im Rezidiv	46
4.2.2.1.	Hämatologische Toxizität	46
4.2.2.2.	Hepatotoxizität	50
4.2.2.3.	Nierentoxizität	50
4.2.3.	Medulloblastom	51
4.3.	Klinische Ergebnisse	51
4.3.1.	Leukämien in Remission	51
4.3.2.	Leukämien im Rezidiv	52
4.3.3.	Medulloblastom	52
5.	Diskussion	53
5.1.	Pharmakokinetik	53
5.1.1.	Normbereich der Methotrexat-Plasmakonzentration bei Methotrexatdosen von 150 mg/m ² , 500 mg/m ² , 750 mg/m ²	53

	Seite
5.1.2.	Relation der Blut-Liquorspiegel
5.2.	Kriterien zur Vorhersage einer drohenden Methotrexattoxizität
5.2.1.	48-Stundenwert der Methotrexat-Plasma-konzentration
5.3.	Hämatologische Toxizität
5.4.	Hepatotoxizität
5.5.	Nierentoxizität
5.6.	Zeitpunkt, Dosis und Dauer der Leukovorin-therapie
5.7.	Klinische Ergebnisse
5.7.1.	Patienten mit ALL im Rezidiv
5.7.2.	Remissionspatienten
6.	Zusammenfassung
7.	Literaturverzeichnis
8.	Lebenslauf

1. Einleitung

Folsäureantagonisten nehmen eine Schlüsselstellung in der Krebstherapie ein, seit 1948 Sidney Farber erstmalig über die Wirksamkeit von Aminopterin bei der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) berichtete (20).

Aminopterin wurde bald durch Amethopterin (Methotrexat) ersetzt. Seither war die Therapie bösartiger Erkrankungen mit Methothrexat einem ständigen Dosiswandel unterworfen (7). Zunächst wurde Methotrexat täglich in Dosen zwischen 1 und 5 mg/m² Körperoberfläche angewandt (13). Durch die klinischen und experimentellen Arbeiten der 'Acute Leukemia Group B' wurde die optimale Dosierung und Behandlungsform ermittelt (1). Dabei zeigte sich die Überlegenheit einer intermittierenden parenteralen Stoßtherapie (30 mg/m² zweimal wöchentlich) gegenüber einer täglichen oralen Behandlung mit 3 mg/m² bei der Therapie der ALL im Kindesalter (59).

Traten nach Methotrexatbehandlung in der Remissionsphase Rezidive auf, war eine erneute Induktionsbehandlung nötig. Früher oder später ließ sich jedoch mit Methotrexat in der bisherigen Dosierung und Anwendungsweise - wie beispielsweise von der 'Acute Leukemia Group B' empfohlen - keine Remission mehr erzielen; der Tumor hatte eine Resistenz entwickelt (3). Häufig ist diese Resistenz jedoch nicht absoluter, sondern nur relativer Natur. Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß ein therapeutischer Erfolg entweder durch Verlängerung der Infusionszeiten (16; 21) oder durch Erhöhung der Methotrexatdosis erzielt werden kann (2; 17).

Die Entwicklung der Methotrexatbehandlung vom "Milligramm"-Dosisbereich bis hin zu Dosen von mehreren Gramm ist ausführlich in einer Übersicht von Bleyer dargestellt (8).

Ebenso wird Methotrexat in einer höheren Dosis als 30 mg/m² angewendet, wenn dieses Medikament als unterstützende Chemotherapie im Rahmen

der Behandlung solider Hirntumoren, z. B. des Medulloblastoms, eingesetzt wird.

Beim Medulloblastom handelt es sich um den häufigsten bösartigen Gehirntumor des Kindesalters; darüber hinaus zeichnet sich dieser Tumor durch eine ausgesprochen rasche und frühe Metastasierungstendenz fast ausschließlich auf dem Liquorweg aus. Diese beiden Fakten unterstreichen die Bedeutung dieses Tumors in der pädiatrischen Onkologie, sowie daraus resultierend, die Bemühungen um eine möglichst wirksame Therapie.

Als Standardbehandlung des Medulloblastoms gelten Operation und Bestrahlung. Der Stellenwert einer Chemotherapie als adjuvante Therapie bei der Behandlung des Tumors war bis Mitte der siebziger Jahre unklar; ebenso war die Wirksamkeit einer Zytostase beim Medulloblastom umstritten.

Aufgrund seines embryonalen Charakters muß das Medulloblastom als grundsätzlich chemotherapieempfindlicher Tumor angesehen werden. Jacobi und Neidhardt berichteten 1974 an Hand von Einzelbeobachtungen bzw. kleinen Fallserien über einen Therapieeffekt verschiedener Zytostatika beim Medulloblastom (40; 49). Neben Vincristin, Nitrosoharnstoffen und Procarbazin erwies sich auch Methotrexat als wirksam.

Die Ergebnisse waren insgesamt jedoch enttäuschend. Es fehlten kontrollierte Studien an einem größeren Krankengut, um über den Stellenwert einer Chemotherapie, z. B. mit Methotrexat, als unterstützende Maßnahme bei der Behandlung des Medulloblastoms - neben der Operation und Bestrahlung - annähernd zuverlässige und verbindliche Aussagen zu machen.

Die Voraussetzungen wurden von der 'Internationalen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie' geschaffen. Diese Organisation begann 1975 eine Studie, in der die Frage beantwortet werden sollte, ob die Anwendung einer unterstützenden Chemotherapie die bisherigen Ergebnisse mit alleiniger Operation und Bestrahlung beim Medulloblastom verbes-

sern kann (39). Vier Jahre später empfahl die Gesellschaft anhand der bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse, jeden Patienten mit Medulloblastom einer Chemotherapie zuzuführen.

Das Ansprechen "resistenter" Tumoren auf höhere Methotrexatdosen führte zu der Modellvorstellung, daß die Aufnahme von Methotrexat in das Zellinnere zunächst eine hohe extrazelluläre Konzentration erfordere, da ein aktives Transportsystem fehle, beziehungsweise eine abnehmende Permeabilität der Zellen für MTX vorliege (23). Der Einsatz höherer Methotrexatdosen erforderte jedoch ein Gegenmittel, das in der Lage war, normales Gewebe vor den Nebenwirkungen des Methotrexat zu schützen, ohne dessen Wirksamkeit auf Tumorzellen herabzusetzen. Als Citrovorumfaktor war dieser Stoff schon lange bekannt; chemisch handelt es sich dabei um N^5 -Formyltetrahydrofolsäure, die als Zwischenprodukt im Folsäurestoffwechsel entsteht (Abb. 1; 2). Die klinische Bedeutung dieser Substanz bei der Methotrexatbehandlung wurde jedoch erst viel später erkannt; Citrovorumfaktor wurde dann aber konsequent bei der Behandlung bösartiger Erkrankungen angewendet (15; 37).

Nachdem Methotrexat auf breiter Ebene Eingang in die Therapie maligner Tumoren gefunden hatte, beschäftigten sich mehrere Arbeitsgruppen mit der Pharmakokinetik dieses an Nebenwirkungen nicht armen Medikamentes. Zunächst wurde jedoch nur für relativ niedrige Methotrexatdosen über Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung berichtet (38). Erst nach Bekanntwerden schwerer Nebenwirkungen unter hochdosierter Methotrexattherapie wurden pharmakokinetische Daten über hochdosierte Therapieschemata mitgeteilt (64; 66).

Pharmakokinetische Daten über eine mittelhochdosierte Methotrexattherapie wurden bisher von Wang (68) und Rechnitzer (55) erarbeitet. Die Kenntnis der Pharmakokinetik im Dosisbereich zwischen 150 mg/m^2 und 1.000 mg/m^2 ist zur optimalen Festlegung der Therapie notwendig, um toxische Nebenwirkungen so weit als möglich zu vermeiden.

Beide Untersucher haben ihre Daten an Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie erhoben, die Methotrexat als 24-Stunden-Infusion erhielten. Es handelt sich jedoch in beiden Fällen um kleine Kollektive

mit einer entsprechend geringen Anzahl an Behandlungszyklen, auf die sich die erhobenen Daten stützen. Es fehlen Untersuchungen über die Pharmakokinetik von Methotrexatinfusionen über einen längeren Zeitraum bei Patienten mit ALL im Rezidiv und beim Medulloblastom. Ferner gibt es keinerlei Erhebungen, mit welchen Dosen bei einer mittelhochdosierten Methothrexatbehandlung noch therapeutische Plasma- und Liquorkonzentrationen erzielt werden können. Ebenso fehlen genaue Daten über die Hepatotoxizität und die Nephrotoxizität bei dieser Form der Methotrexatbehandlung.

Ziel dieser Arbeit ist

- einen Normbereich für die Methotrexat-Plasmakonzentration im Zeitraum 0 - 72 Stunden nach Beginn einer Infusion von mittelhochdosiertem MTX in Dosen von 150 mg/m^2 , 500 mg/m^2 und 700 mg/m^2 Körperoberfläche über 24 Stunden anzugeben
- in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik die Toxizität des Methotrexates zu untersuchen.

2. GRUNDLAGEN

2.1. Chemie des Methotrexat

Methotrexat ist strukturell der Folsäure eng verwandt und entsteht aus dieser durch Substitution der Hydroxylgruppe an Position 4 des Pteridinkernes durch eine Aminogruppe und gleichzeitige Methylierung in Stellung 10 (Abb. 1). Als schwach saure Dikarbonsäure besitzt sie zwei Dissoziationskonstanten; $pK_1 = 4,8$; $pK_2 = 5,5$. Bei physiologischem pH ist Methotrexat lipidunlöslich und liegt zudem in ionisierter Form vor. Unter diesen Umständen passiert also Methotrexat keine Lipidmembranen, wie z. B. die Blut-Hirn-Schranke (7).

2.2. Wirkmechanismus des Methotrexat

Methotrexat wird fest, jedoch reversibel, an das Enzym Dihydrofolatreduktase gebunden; dadurch wird die Reduktion der Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure und weiteren reduzierten Folaten blockiert (Abb. 2). Durch den Enzymblock kommt es in der Zelle zu einer Verarmung an reduzierten Folaten, die im Stoffwechsel bei einer Vielzahl biochemischer Reaktionen C_1 -Bruchstücke übertragen. Reduzierte Folate sind an der Biosynthese von Thymidin und somit an der DNA-Synthese beteiligt. Weiterhin wirken Tetrahydrofolate als Coenzyme bei der Überführung von Glycin in Serin und von Homocystein in Methionin (Abb. 2); bei einem Fehlen dieser Coenzyme wird somit die Eiweißbiosynthese gehemmt (7). Reduzierte Folate sind notwendig zur Synthese und für den Stoffwechsel von Überträgerstoffen im Zentralnervensystem. Folglich führt ein durch Methotrexat hervorgerufener Mangel an Tetrahydrofolaten zu neurotoxischen Erscheinungen (8).

Eine Verarmung an Tetrahydrofolsäure führt weiterhin zu einer Hemmung der Purinbiosynthese und damit zu einer Veränderung der Synthese von RNA und DNA (7).

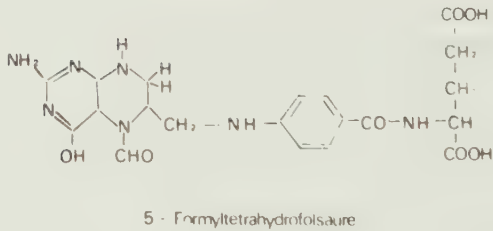
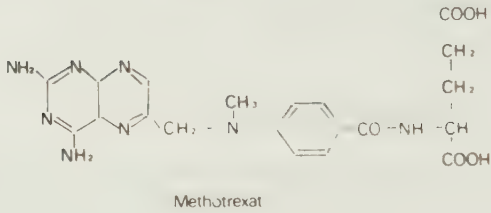
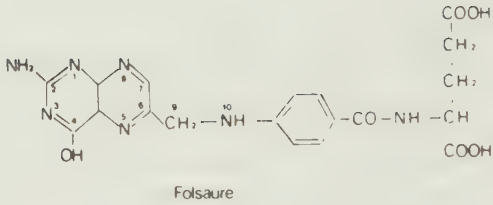


Abbildung 1:

Strukturformeln von Folsäure, Methotrexat und 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure (Leukovorin).

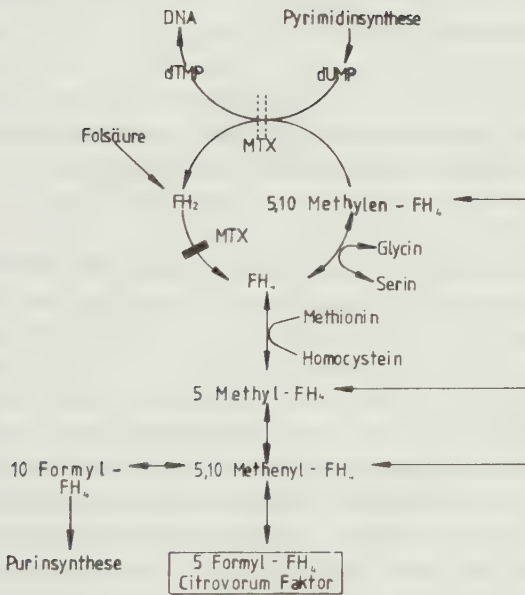


Abbildung 2:

Darstellung des Folsäurezyklus und der Angriffspunkte des Methotrexat (MTX).

FH_2 = Dihydrofolsäure; FH_4 = Tetrahydrofolsäure; dUMP = Uridinmonophosphat; dTMP = Thymidinmonophosphat; dTR = Thymidin.

In menschlichen Zellen wird durch Methotrexat die DNA-Synthese in weit größerem Ausmaß gehemmt als die RNA-Synthese. Der entscheidende Wirkmechanismus für die zytotoxische Aktivität von Methotrexat ist die Hemmung der Thymidinmonophosphatsynthese (36). Die Bedeutung dieses Mechanismus liegt darin, daß Methotrexat speziell während der S-Phase wirkt, dieses Medikament somit in seiner Wirkung abhängig vom Zellcyclus ist. Hinzu kommt, daß die Dauer des S-Phase-Effektes von der verabreichten Methotrexatdosis abhängt (7).

Goldmann konnte zeigen, daß zur maximalen Hemmung der DNA-Synthese nicht nur alle Bindungsstellen der Dihydrofolatreduktase durch Methotrexat abgesättigt sein müssen, sondern daß darüber hinaus freies Methotrexat intrazellulär im Überschuß vorliegen muß (30).

Die intrazelluläre Aufnahme von Methotrexat in kleinen Konzentrationen erfolgt durch einen aktiven, energieabhängigen Transportmechanismus. Über dasselbe "Carrier"-System werden auch die natürlich vorkommenden reduzierten Folate aktiv in die Zelle transportiert (29; 69). Methotrexat wirkt damit auch über eine kompetitive Hemmung des Transportsystems für reduzierte Folate. Die Methotrexataufnahme ist abhängig vom pH, von der Temperatur und hemmbar durch Sulfhydrylgruppen tragende Agentien. Bei sehr hohen extrazellulären Konzentrationen über 2×10^{-5} mol/l wird Methotrexat sehr wahrscheinlich durch passive Diffusion aufgenommen (69). Dieser Mechanismus wird bei Tumoren wirksam, die eine Resistenz gegen konventionelle Methotrexatdosen entwickelt haben und bei denen es gelingt, durch Erhöhung der Dosis und damit der extrazellulären Konzentration eine "therapeutische Antwort" auszulösen (18).

2.3. Metabolisierung und Ausscheidung

Nach intravenöser Ausscheidung kommt es zu einer raschen Verteilung von Methotrexat im Extrazellulärraum und im Gesamtkörperwasser (35). Die Bindung im Plasma erfolgt zu über 80 % an Albumin (63). Die Verteilung von Methotrexat in interstitielle Flüssigkeitsräume, wie

Liquor, Pleuraraum und Peritonealhöhle erfolgt langsam und weist Merkmale eines passiven Transportes auf. Bei krankhafter Vergrößerung dieser sogenannten "dritten Räume", z. B. bei Aszites oder Pleuraerguß, können diese als "Reservoir" wirken, aus dem Methotrexat verzögert freigesetzt wird (67).

In Abhängigkeit von der verabreichten Dosis wird ein mehr oder minder großer Anteil des Methotrexats im menschlichen Organismus verstoffwechselt. Bei intravenöser Verabreichung von 30 mg/m^2 Methotrexat beträgt der metabolisierte Anteil weniger als 10 % der verabreichten Menge (67). Werden jedoch sehr hohe Methotrexatdosen angewandt, wie das bei einigen soliden Tumoren der Fall ist, so kann der metabolisierte Anteil über 30 % der verabreichten Menge betragen. Als wichtigster Metabolit ist 7-Hydroxymethotrexat zu nennen, das während der Späthpase der Methotrexatelimination im Urin erscheint. 7-Hydroxymethotrexat ist im Vergleich zu Methotrexat viermal schlechter urinlöslich (8).

Weniger als 10 % des Methotrexats werden über die Leber in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden; anzumerken ist, daß in der Leber die höchsten Methotrexatgewebekonzentrationen gefunden werden (2). Der über die Gallenwege ausgeschiedene Methotrexatanteil unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf, so daß letztlich knapp 2 % einer intravenös gegebenen Methotrexatdosis mit den Faeces ausgeschieden werden (38; 67).

Der weitaus größte Anteil des Methotrexat wird jedoch über die Nieren ausgeschieden, wobei 90 % innerhalb von 24 Stunden eliminiert werden. Nach 30 Stunden sind bereits 95 % ausgeschieden (35). Methotrexat wird sowohl glomerulär filtrierte als auch aktiv tubulär sezerniert (45). Im sauren Urin fällt MTX aus, wenn seine Konzentration $2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ überschreitet. Bei alkalischem Urin-pH ist diese Löslichkeit bedeutend größer (64). Diesen Effekt nützt man bei der Methotrexatbehandlung therapeutisch aus, indem man durch Alkalinisierung des Urins ein Ausfällen des Medikamentes im Tubulussystem und die damit verbundene Nierenschädigung vermeidet. Zudem ist bei alkalischem Urin

Methotrexat im Tubuluslumen ionisiert, wodurch die tubuläre Reabsorption erschwert und die Nettoausscheidung beschleunigt ist (8).

2.4. Methotrexattoxizität

Toxische Erscheinungen unter höheren Methotrexatdosen betreffen vorwiegend Gewebe mit hoher Zellumsatzrate wie Knochenmark und Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes.

Entscheidend für die Schwere der Toxizität ist nicht so sehr die Höhe der absoluten Methotrexat-Plasmakonzentration, sondern die Zeitdauer, in der die Zellen einer kritischen minimalen Methotrexat-Plasmakonzentration - genannt "Schwellenkonzentration" - ausgesetzt sind (24; 52). Der kritische Schwellenwert für Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes sowie für Knochenmark, wird mit 2×10^{-8} mol/l angegeben (11), die kritische Zeitspanne mit 36 - 48 Stunden (4; 24; 44). Für Nierengewebe liegt die kritische Schwellenkonzentration bei 10^{-4} mol/l, die kritische Expositionsdauer bei wenigen Stunden (8).

2.5. Aufhebung der Methotrexatwirkung durch Citrovorumfaktor (Leukovorin*)

Leukovorin (5-Formyltetrahydrofolsäure) ist in der Lage, die Wirkung von Methotrexat aufzuheben. Die Stellung von Citrovorumfaktor im Folsäurestoffwechsel und seine Beziehung zur Purin- und Pyrimidinsynthese und somit letztlich zur DNA-Synthese sind in Abb. 2 dargestellt. Durch Citrovorumfaktor können also der Zelle direkt reduzierte Folate zugeführt werden, wobei der durch Methotrexat verursachte Enzymblock an der Dihydrofolsäurereduktase umgangen wird. Bei einem hohen extrazellulären Verhältnis von Citrovorumfaktor zu Methotrexat kann Citrovorumfaktor den weiteren Einstrom von Methotrexat in die Zelle blockieren, ja sogar den Ausstrom von Methotrexat aus der Zelle über einen entgegengesetzten Transportmechanismus erleichtern (4). An Tumorzellen, z. B. Lymphoblasten, werden Methotrexat und Citrovorumfaktor

* Handelsname

tor durch das gleiche aktive Transportsystem in die Zelle aufgenommen (29). Wesentlich ist die Tatsache, daß es nicht zur Aufhebung der Methotrexatwirkung auf die Tumorzelle kommt, obwohl diese Beobachtung bei mittelhochdosierter Methotrexattherapie bisher nur durch klinische Erfahrungen untermauert wird.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Patienten- und Therapieprotokolle

3.1.1. Akute lymphatische Leukämie

3.1.1.1. Vorbemerkungen

An der Universitätskinderklinik München wurden zwei Behandlungsprotokolle entwickelt - ALL 77-01; ALL 77-02 - nach denen Kinder und jugendliche Patienten mit neu diagnostizierter akuter lymphatischer Leukämie (ALL) therapiert wurden. Das gemeinsame Konzept beider Protokolle setzte sich aus folgenden Teilfaktoren zusammen (33; 34):

1. einer aggressiven Polychemotherapie zum Erreichen der Remission
2. einer Intensivphase, in der eine Kombinationsbehandlung mit mittelhochdosiertem Methotrexat und weiteren antitumörösen Medikamenten entsprechend dem "COAP"-Schema, durchgeführt wurde
3. der Therapie einer meningealen Aussaat der Erkrankung
4. einer kombinierten Behandlung zur Erhaltung der Remissionsphase

Ausgehend von den Erkenntnissen des Protokolles ALL 77-01 - insbesondere über die mittelhochdosierte Methotrexattherapie - wurde im Protokoll ALL 77-02 die mittelhochdosierte Methotrexatbehandlung für alle Patienten verändert; für Risikopatienten wurde die Therapie zusätzlich intensiviert (34).

Als Risikopatient wurde angesehen

1. wer eine Leukozytenzahl von über 25.000 mm^3 bei Diagnosestellung aufwies
2. wer in der immunologischen Klassifikation der Leukämiezellen undifferenzierte Leukozyten oder T-Lymphozyten aufwies.

3. wer bei Diagnosestellung bereits einen faßbaren Befall des zentralen Nervensystems durch die Leukämie aufwies.

3.1.1.2. Protokoll ALL 77-01 (Abb. 3)

Abb. 3 veranschaulicht das Behandlungskonzept, das diesem Protokoll zugrunde liegt. Zwischen dem 1.01.1977 und dem 31.12.1979 wurden 104 Kinder mit neudiagnostizierter ALL nach diesem Protokoll behandelt (33).

Während der Intensivphase erhielten die Patienten einmalig 150 mg/m^2 Methotrexat als 24-Stunden-Infusion; 15 mg/m^2 wurden vor Infusionsbeginn als intravenöse Bolusinjektion verabreicht. Die Leukovorintherapie begann zwei Stunden nach Infusionsende; insgesamt wurden 8 Dosen zu je 15 mg/m^2 oral in 6-stündigem Abstand gegeben.

Vor Beginn der Methotrexattherapie wurden folgende Laborwerte kontrolliert: Blutbild (Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten), Kreatinin sowie Transaminasen.

Innerhalb von 10 Tagen nach Ende der Infusionstherapie wurde das Blutbild bei allen Patienten mehrfach kontrolliert. Eine Kontrolle der übrigen Laborparameter wurde nicht in allen Fällen durchgeführt.

Die Blutabnahme für die Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentration erfolgte 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Infusionsbeginn. Bei 17 Zyklen wurde der Methotrexat-Plasmaspiegel bestimmt; zusätzlich wurde bei 10 Zyklen die Methotrexat-Liquorkonzentration am Ende der Infusion bestimmt.

Ein haematologisch-toxischer Verlauf war definiert durch einen Abfall der Leukozyten unter $1.000/\text{mm}^3$ und/oder Thrombozytenabfall unter $100.000/\text{mm}^3$.

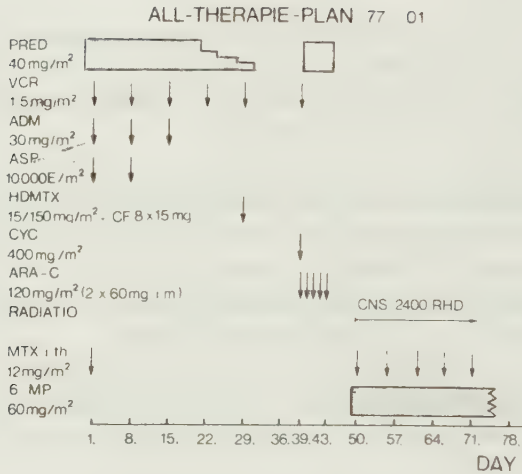


Abbildung 3:

Therapieprotokoll ALL 77-01 zur Behandlung von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie.

PRED = Prednison; VCR = Vincristin; ADM = Adriamycin; ASP = Asparaginase; HDMTX = mittelhochdosiertes Methotrexat; CF = Leukovorin; CYC = Cyclophosphamid; ARA-C = Arabinosyl-Dytosin; 6-MP = 6-Mercaptopurin.

3.1.1.3. Protokoll ALL 77-02

Zwischen Dezember 1979 und Januar 1983 wurden 108 Kinder mit neu aufgetretener akuter lymphatischer Leukämie nach diesem Protokoll behandelt (34). Innerhalb des Protokolles wurden zwei verschiedene Behandlungskonzepte angewandt (Abb. 4) je nach dem, ob es sich um einen Nichtrisikopatienten oder einen Risikopatienten handelte (siehe Seite 12 und Abb. 4).

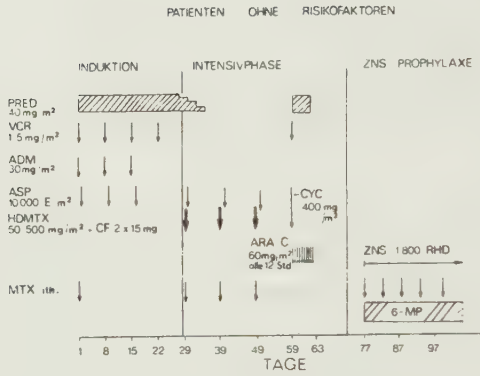
Alle nach dem Protokoll ALL 77-02 behandelten Patienten erhielten drei mittelhochdosierte Methotrexatinfusionen über jeweils 24 Stunden, entsprechend den Empfehlungen von Freeman et al. (21). Gegenüber dem Schema von Freeman wurden in der Studie ALL 77-02 jedoch die Dosiskombination und das Dosierungsintervall geändert; die Gesamtdosis betrug in jedem Zyklus 500 mg/m^2 ; 50 mg/m^2 wurden vor Infusionsbeginn als intravenöse Bolusinjektion gegeben. Der Abstand zwischen den einzelnen Behandlungszyklen betrug 10 Tage.

24 Stunden nach Ende der Infusion erhielten die Patienten 10.000 I.E. Asparaginase intramuskulär. Zum gleichen Zeitpunkt wurden 15 mg/m^2 Leukovorin gegeben; die Leukovoringabe wurde 6 Stunden später wiederholt.

Bereits mehrere Stunden vor dem Start der Methotrexatinfusion wurden die Patienten zur ausreichenden Hydrierung mit einem Glucose-Kochsalz-Gemisch in gewichtsbezogener Dosierung infundiert, das Natriumbicarbonat zur Einstellung des Urins auf pH-Werte zwischen 7 und 8 enthielt. Dieser pH-Bereich wurde während der Methotrexatinfusion beibehalten.

Folgende Laborwerte wurden vor Beginn der Methotrexatinfusion kontrolliert: Blutbild (Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten), Kreatinin sowie Transaminasen. Innerhalb von 10 Tagen wurde das Blutbild bei allen Patienten mehrfach kontrolliert; eine Kontrolle der übrigen Laborwerte wurde nicht in allen Fällen durchgeführt.

Bei 92 Infusionszyklen wurde eine Bestimmung der Methotrexat-Plasmaspiegel durchgeführt; die Blutentnahmen erfolgten 12, 24, 48 und 72



ALL 77-02 RISIKOPATIENTEN

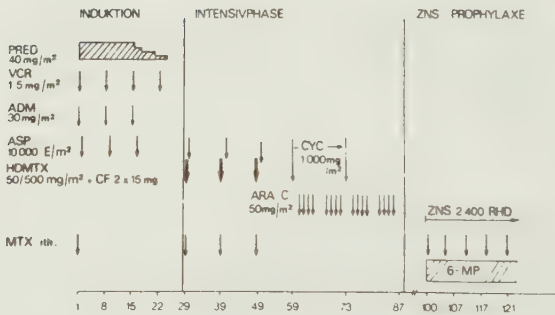


Abbildung 4:

Therapieprotokoll ALL 77-02 für Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie ohne Risikofaktoren (oben) und Risikofaktoren (unten). (Abkürzungen siehe Abb. 3).

Stunden nach Beginn der Methotrexatinfusion. In einem Teil der Fälle wurden bereits in den ersten drei Stunden nach Infusionsbeginn MTX-Plasmaspiegelbestimmungen in 15-minütigem Abstand durchgeführt. Bei 25 Zyklen wurde am Ende der Infusion zusätzlich die Methotrexat-Liquorkonzentration bestimmt.

Der Großteil der Liquorbestimmungen (22/25) wurde an zwei Patienten durchgeführt, die an einer ZNS-Leukämie litten und MTX als Infusion, sowie intrathekal im Abstand von 4 - 6 Wochen erhielten (siehe Protokoll ALL ZNS-78, Seite 18).

Ein hämatologisch-toxischer Verlauf war definiert durch einen Abfall der Leukozyten unter $1.000/\text{mm}^3$ und/oder Thrombozytenabfall unter $100.000/\text{mm}^3$.

3.1.1.4. Rezidivprotokoll ALL 78

15 Patienten mit ALL im 3. bis 5. hämatologischen Rezidiv wurden einer mittelhochdosierten Methotrexattherapie zugeführt. Die MTX-Dosis betrug $50 \text{ mg}/\text{m}^2$ gefolgt von $500 \text{ mg}/\text{m}^2$ als 24-Stunden-Infusion. 8 Patienten erhielten 12 Stunden nach Infusionsende $15 \text{ mg}/\text{m}^2$ Leukovorin oral; die Leukovoringabe wurde 3 - 5 mal alle 6 Stunden wiederholt. 7 Patienten erhielten die erste Leukovorindosis erst 24 Stunden nach dem Ende der Methotrexatinfusion; nach 6 Stunden wurde die Leukovoringabe wiederholt, so daß also insgesamt nur 2 Dosen Leukovorin gegeben wurden. Zusätzlich erhielten die Patienten am Beginn der Leukovorintherapie $10.000 \text{ I.E.}/\text{m}^2$ Asparaginase intravenös. Alle Patienten erhielten jeweils 3 Methotrexatinfusionen im Abstand von 10 Tagen.

Die Infusionsbehandlung und die Bestimmung der Laborwerte entsprach dem Vorgehen im Therapieprotokoll ALL 77-02 (siehe Seite 15 und Abb. 4).

Insgesamt wurden bei den 15 Patienten 45 Therapiezyklen durchgeführt, von denen 44 Zyklen ausgewertet werden konnten; die Bestimmung der

Methotrexat-Plasmaspiegel erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach Beginn der Infusion.

Ein toxischer Verlauf war definiert durch das Auftreten eines schwer verlaufenden Exanthems, einer schweren Stomatitis und vor allem durch die Länge der Knochenmarksdepression.

3.1.1.5. Protokoll bei ZNS-Rezidiv; ALL ZNS-78

Bei Patienten mit ALL und isoliertem Rezidiv im ZNS wurden in 4- 6-wöchigem Abstand Methotrexatinfusionen über 24 Stunden in einer Dosierung von 500 mg/m^2 durchgeführt. 24 Stunden nach Infusionsende wurden 2 Dosen Leukovorin zu je 15 mg im Abstand von 6 Stunden gegeben. Am Ende der Methotrexatinfusion wurde MTX intrathekal gegeben. Die gleichzeitige Bestimmung der MTX-Konzentration im Serum und Liquor am Ende der MTX-Infusion erfolgte bei 22 Zyklen. Die Liquorabnahme zur MTX-Spiegelbestimmung erfolgte vor der intrathekalen MTX-Applikation.

3.1.2. Medulloblastom; Therapieprotokoll MB 79

Ziel dieser Studie war es, den Wert einer sogenannten "adjuvanten" Chemotherapie beim Medulloblastom zu untersuchen. Abb. 5 zeigt graphisch das Behandlungskonzept dieses Therapieprotokolles. Methotrexat wird in diesem Protokoll mit einem weiteren zytostatisch wirkenden Medikament- hier Vincristin - kombiniert. Methotrexat wurde als 24-Stunden-Infusion in einer Dosierung von 700 mg/m^2 verabreicht. Der Infusion voraus ging eine intravenöse Bolusinjektion von 70 mg/m^2 . 12 Stunden nach Beendigung der Methotrexattherapie begann die Leukovorinbehandlung. Insgesamt wurden 6 Dosen zu je 15 mg/m^2 Leukovorin im Abstand von 6 Stunden oral verabreicht. Zwischen 1979 und 1980 wurden 6 Patienten mit Medulloblastom - 3 davon im Rezidiv - in die Studie aufgenommen.

Bei 26 Behandlungszyklen wurden 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Infusionsbeginn Methotrexat-Spiegelbestimmungen durchgeführt. Darüber

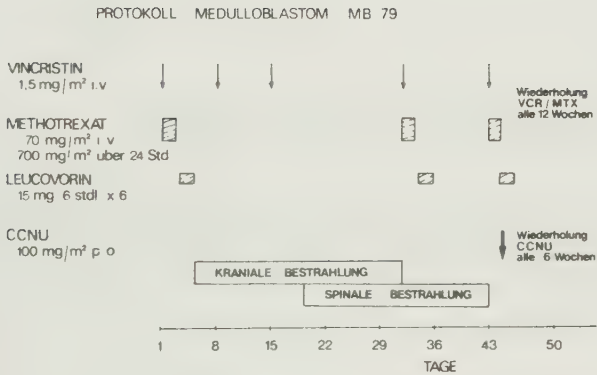


Abbildung 5:

Therapieprotokoll MB 79 zur Behandlung von Patienten mit Medulloblastom.

hinaus wurde bei 11 Zyklen am Ende der Infusion die Konzentration von Methotrexat im Liquor bestimmt.

Von der Definition eines toxischen Verlaufes wurde abgesehen, da Methotrexat mit Vincristin kombiniert angewendet wurde; somit war nicht sicher zu beurteilen, ob ein toxischer Verlauf durch Methotrexat bedingt war.

3.2. Methode und Materialien

3.2.1. Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentration

Die Methotrexat-Plasmakonzentrationen wurden radioimmunologisch bestimmt. Die Trennung von freiem und antikörpergebundenem Methotrexat erfolgte nach der Methode der Kohleadsorption. Die genaue Beschreibung der Entwicklung dieses Testes für die klinische Routine findet sich bei Wiesner (70).

Die Patientenproben wurden als Serum- oder Citratplasma Proben eingesetzt. Untersuchungsmaterial, das nicht sofort verarbeitet werden konnte, wurde bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

3.2.2. Verwendete Materialien

Methotrexat (Lederle), ^3H -Methotrexat mit einer Aktivität von 14,5 Ci/mmol (Amersham, Buchler), 0,01 m Trispuffer (pH 7,4), Norit A (Serva), Dextran T 70 (Pharmacia Fine Chemicals), Gamma-Globulin vom Rind, reinst (Behringwerke), Natrium-Acid (Merck), Szintillationsflüssigkeit Quickszint 402 (Zinsser), Citrovorumfaktor und Folsäure (Serva).

Das Antiserum wurde im Labor selbst durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Methotrexat-Rinderalbumin-Konjugat nach der Methode von Loeffler hergestellt (46).

Die Kohle-Dextransuspension zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Methotrexat hatte folgende Zusammensetzung: 1 g Norit A, 0,1 g Dextran T 70, 0,2 g Gamma-Globulin, 0,064 g Natrium-Acid; diese Bestandteile wurden in 200 ml Arbeitspuffer gelöst. Das Verdünnungsverhältnis für ^3H -Methotrexat im Puffer war so gewählt, daß 1 ml der Lösung 100.000 Counts pro Minute (cpm) enthielt. Das Antiserum wurde mit Puffer 1 : 1.200 verdünnt. Die Proben wurden in Einweg-Glasröhrchen (11 x 75 mm) angesetzt. Die Messung der Radioaktivität der Testansätze erfolgte in einem Liquid-Szintillation-Counter Tricarb 2450 (Packard).

3.2.3. Durchführung der Methotrexatbestimmung mit dem Radioimmunoassay

1. Zugabe von 200 Mikroliter ^3H -MTX (20.000 cpm) und 200 Mikroliter Antiserum (1 : 1.200) zu 5 Mikroliter einer Patientenprobe
2. Gemisch 15 Sekunden schütteln und 90 Minuten im Eiswasserbad inkubieren
3. Trennung von freiem und antikörpergebundenem Methotrexat mit der Methode der Kohleadsorption:
 - Zugabe von 500 Mikroliter Kohle-Dextransuspension nach Ablauf der Inkubationszeit
 - Gemisch 15 Minuten stehen lassen
 - 10 Minuten mit 1.800 g bei 4° C zentrifugieren
 - Dekantieren der Überstände mit dem antikörpergebundenen Methotrexat in 10 ml Szintillationsflüssigkeit
4. Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler über 4 Minuten

Proben und Standards wurden jeweils dreifach eingesetzt.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden im Labor Standardseren mit einer Methotrexatkonzentration zwischen $2,5 \times 10^{-8}$ mol/l und $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l durch Zugabe von Methotrexat zu Normalserum hergestellt.

Patientenproben, die während und am Ende einer 24-Stunden-Infusion abgenommen wurden und MTX-Plasmakonzentrationen von 10^{-4} mol/l enthielten, mußten vor der MTX-Bestimmung mit Normalserum 1 : 1.000 verdünnt werden.

Die gemessene Aktivität in cpm ergab sich als arithmetisches Mittel der Aktivitäten in den drei eingesetzten Proben. Für jede Meßserie wurde eine eigene Eichkurve erstellt. Die in den Standardproben gemessenen Aktivitäten wurden gegen die eingesetzten Methotrexatkonzentrationen aufgetragen. Die Standardkurve wies ihren empfindlichsten Bereich zwischen $2,5 \times 10^{-8}$ mol/l und $2,5 \times 10^{-6}$ mol/l auf; durch entsprechende Verdünnung von Proben mit hoher Konzentration ließ sich der Meßbereich bis $2,5 \times 10^{-4}$ mol/l erweitern. An dieser Eichkurve konnten die unbekannten MTX-Konzentrationen der Patientenproben abgelesen werden.

3.3. Qualität der Methotrexatbestimmung

Die Prüfung auf Spezifität des Antiserums für Methotrexat erfolgte durch Testung der Kreuzreaktion gegen Folsäure und Citrovorum-Faktor; gegen beide Substanzen lag die Kreuzreaktivität unter 0,01 %.

Aus der 12-fachen Bestimmung eines Kontrollserums in gleichen Assay ergab sich die Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie: Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 3,3 %.

Die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag wurde durch Bestimmung zweier Kontrollseren verschiedener Methotrexat-Konzentration an zwölf aufeinanderfolgenden Bestimmungstagen ermittelt. Bei einem Mittelwert von $8,7 \times 10^{-7}$ mol/l errechnete sich der Interassay-Variationskoeffizient zu 9,8 %, bei einem Mittelwert von $3,5 \times 10^{-7}$ mol/l zu 5,1 %.

4. ERGEBNISSE

4.1. Pharmakokinetik

4.1.1. Patienten mit Leukämie in Remission - Blutspiegelbestimmung bei einer Methotrexatdosis von 150 mg/m^2

Die Pharmakokinetik von Methotrexat nach einer niedrigdosierten Infusionstherapie mit 150 mg/m^2 über 24 Stunden, der ein Bolus von 15 mg/m^2 als intravenöse Injektion vorausging, ist in Abb. 6 dargestellt. Aufgrund der wenigen durchgeführten MTX-Plasmaspiegelbestimmungen konnten nur 9 hämatologisch atoxische Behandlungszyklen (Abfall der Leukozyten nicht unter $1.000/\text{mm}^3$ und der Thrombozyten nicht unter $100.000/\text{mm}^3$) zur Aufstellung eines Normbereiches herangezogen werden. Nach Ende der Infusion kam es zu einem raschen Abfall der Methotrexat-Serumkonzentration innerhalb der ersten 24 Stunden mit einer mittleren Halbwertszeit von 4,3 Stunden, gefolgt von einem langsameren Abfall innerhalb der nächsten 24 Stunden mit einer mittleren Halbwertszeit von 16,3 Stunden (Tab. 3).

Der Normbereich wurde definiert durch die 5. und 95. Percentile der Methotrexat-Serumkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten (Tab. 1).

Aus Tabelle 1 geht auch hervor, daß bei allen Patienten Methotrexat-Serumkonzentrationen erzielt wurden, die über $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ liegen; einer Konzentration also die notwendig ist, um die DNS-Synthese leukämischer Zellen über 90 % zu hemmen (37).

4.1.2. Patienten mit Leukämie in Remission - Blutspiegelbestimmung bei einer Methotrexatdosis von 500 mg/m^2

Abbildung 7 zeigt die Pharmakokinetik von Methotrexat nach Infusion einer mittelhohen Dosis von 500 mg/m^2 , der ein Bolus von 500 mg/m^2 als intravenöse Injektion vorausging. Für die Aufstellung des Normbereiches wurden 25 hämatologisch atoxische Behandlungszyklen (Abfall der Leukozyten nicht unter $1.000/\text{mm}^3$ und der Thrombozyten nicht unter

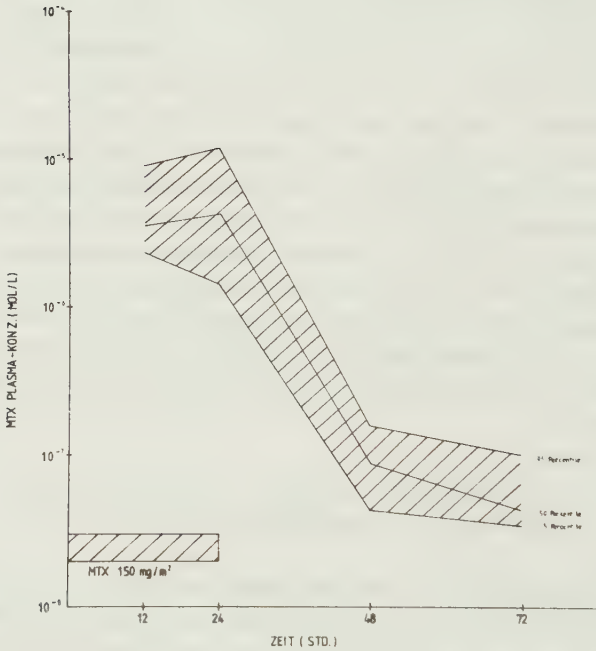


Abbildung 6:

Normbereich der MTX-Plasmakonzentrationen bei 6 Patienten mit ALL in Remission während und nach einer 24-stündigen mittelhochdosierten MTX-Infusion von 150 mg/m² (siehe auch Tabelle 1).

Zeit	Anzahl der MTX- Bestimmungen	MTX-Plasmakonzentration (mol/l) Percentilen		
		5.	50.	95.
12 Stunden	13	$2,3 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-6}$	$9,0 \times 10^{-6}$
Infusionsende	17	$1,4 \times 10^{-6}$	$4,1 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$
24 Std. später	9	$4,3 \times 10^{-8}$	$8,8 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-7}$
48 Std. später	3	$3,4 \times 10^{-8}$	$4,5 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-7}$

Tabelle 1:

Methotrexat-Plasmakonzentrationen während und nach einer Methotrexat-Infusion mit 150 mg/m^2 über 24 Stunden bei Patienten mit ALL in Remission (siehe Abb. 6).

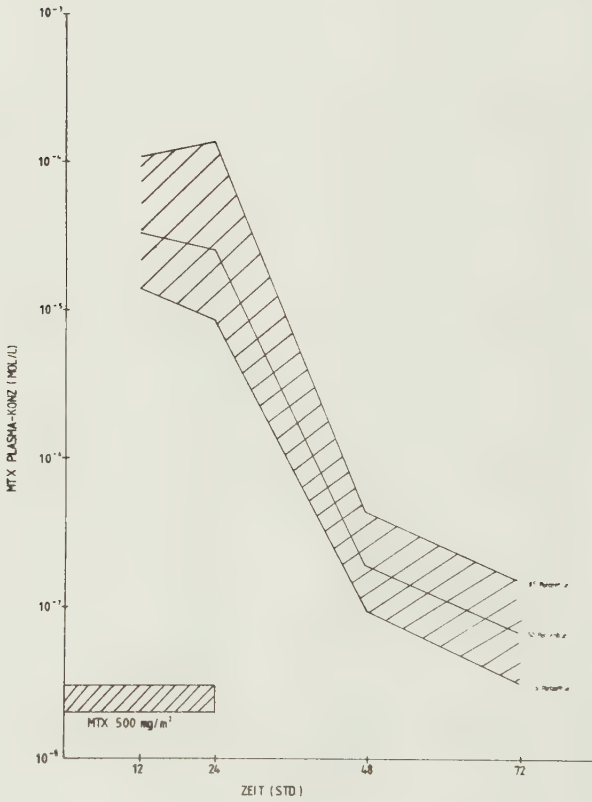


Abbildung 7:

Normbereich der MTX-Plasmakonzentration bei Patienten mit ALL in Remission während und nach einer 24-stündigen mittelhochdosierten MTX-Infusion von 500 mg/m² (siehe auch Tabelle 2).

Zeit	Anzahl der MTX- Bestimmungen	MTX-Plasmakonzentrationen (mol/l) Percentilen		
		5.	50.	95.
12 Stunden	20	$1,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-4}$
Infusionsende	38	$8,4 \times 10^{-6}$	$2,6 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-4}$
24 Std. später	35	$9,5 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-7}$	$4,3 \times 10^{-7}$
48 Std. später	18	$3,1 \times 10^{-8}$	$6,8 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-7}$

Tabelle 2:

Methotrexat-Plasmakonzentrationen während und nach einer Infusion mit 500 mg/m^2
Methotrexat über 24 Stunden bei Patienten mit ALL in Remission ohne hämatologische
Toxizität (siehe auch Abb. 7).

MTX Dosis (mg/m ²)	Mittlere Halbwertszeiten des MTX (Std.) Infusionsende - 24 Std. 24 - 48 Std.
150	3,7 16,3
500	3,4 16,0
700	3,9 16,3

Tabelle 3:

Mittlere Halbwertszeiten der Methotrexat-Elimination bei Patienten mit ALL in Remission und mit Medulloblastom nach einer 24-Stunden-Infusion mit verschiedenen MTX-Dosen; die erste, schnelle Halbwertszeit umfaßt den Zeitraum von Infusionsende bis 24 Stunden später; die zweite langsame Halbwertszeit repräsentiert den MTX-Eliminationszeitraum 24 - 48 Stunden nach Infusionsende.

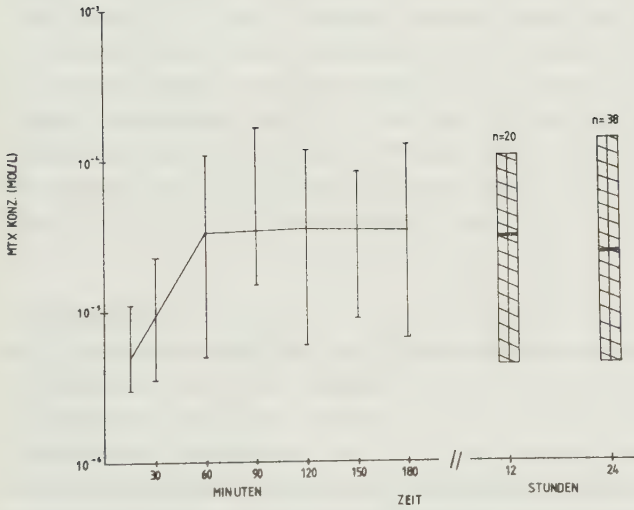


Abbildung 8:

MTX-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit ALL in Remission innerhalb der ersten drei Stunden nach Beginn einer mittelhochdosierten MTX-Therapie mit 500 mg/m^2 im Vergleich zu den MTX-Plasmakonzentrationen 12 und 24 Stunden nach Infusionsbeginn (n = Anzahl der Bestimmungen).

100.000/mm³) zugrunde gelegt. Der Normbereich wurde ebenfalls durch die 5. und 95. Percentile der Methotrexat-Plasmakonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten festgelegt (Tab. 2).

Bei 5 Therapiezyklen wurden zusätzliche Messungen in halbstündigen Abständen zwischen 15 und 180 Minuten ausgeführt. Anhand dieser Messungen sollte eine Aussage darüber gemacht werden, wie schnell sich ein Konzentrationsgleichgewicht einstellt, bzw. innerhalb welches Zeitraumes wirksame MTX-Plasmakonzentrationen erreicht werden. Aus Abbildung 8 geht hervor, daß schon nach 15 Minuten Methotrexat-Plasmakonzentrationen erreicht werden, die innerhalb des Konzentrationsbereiches nach 12 - 24 Stunden liegen. Bereits nach 1 Stunde entspricht der Medianwert der Methotrexat-Plasmakonzentration dem nach 12 Stunden (Abb. 8).

Nach Beendigung der Infusion kommt es zu einem raschen Abfall der Methotrexat-Plasmakonzentration mit einer mittleren Halbwertszeit von 3,4 Stunden innerhalb der ersten 24 Stunden, gefolgt von einem langsameren Abfall in den nächsten 24 Stunden mit einer mittleren Halbwertszeit von 16 Stunden (Tab. 3). Da aus einer erhöhten Methotrexat-Plasmakonzentration 24 Stunden nach Infusionsende auf eine verzögerte Elimination des Medikamentes geschlossen werden kann (siehe auch Tab. 4), wurde dieser Wert als wichtigster Parameter für das Auftreten toxischer Erscheinungen herangezogen.

Bei der mittelhochdosierten Methotrexat-Therapie mit 500 mg/m² wurden während der Infusion und 24 Stunden später signifikant (2 p < 0,02) höhere Methotrexat-Plasmakonzentrationen gemessen, als bei der Therapie mit 150 mg/m² MTX; der Unterschied im 48-Stundenwert beider Therapieschemata war jedoch nicht signifikant.

4.1.3. Patienten mit Leukämie im Rezidiv

Bei 15 Patienten, die wegen akuter Leukämie im Rezidiv mit einer mittelhohen Methotrexatdosis von 500 mg/m² therapiert wurden, konnten insgesamt 44 Behandlungszyklen ausgewertet werden. Bei 11 Zyklen

Mittlere HWZ	Halbwertszeiten des Methotrexat (Std.)	
	Inf. Ende - 24 Std.	24 - 48 Std.
	3, 4 Std.	16 Std.
Patient 1	11	5
2	20	6
3	5	8
4	8	-
5	5	28
6	4	63
7	4	17
8	3,7	58

Tabelle 4:

Halbwertszeiten von Methotrexat nach mittelhochdosierter MTX-Gabe (500 mg/m^2) bei 8 Patienten mit Leukämie im Rezidiv und einer MTX-Plasmakonzentration von $5 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ nach 24 Stunden (siehe auch Abb. 9).

wurden 24 Stunden nach Therapieende Methotrexat-Plasmakonzentrationen gemessen, die den oberen Normbereich von $4,3 \times 10^{-7}$ mol/l überstiegen; bei 8 dieser Zyklen lagen die MTX-Plasmakonzentrationen zum gleichen Zeitpunkt über dem höchsten - bei Patienten mit ALL in Remission gemessenen - Wert von 5×10^{-7} mol/l (Abb. 9).

Tabelle 4 zeigt die Halbwertszeiten von Methotrexat während dieser Behandlungszyklen. Bei allen Patienten ist im Intervall 'Infusionszyklus - 24 Stunden später' die Halbwertszeit verlängert. Während der nächsten 24 Stunden ist bei 4 Patienten die Halbwertszeit verlängert, bei Patient 6 sogar um das Vierfache der mittleren Halbwertszeit bei Patienten mit Leukämie in Remission im gleichen Zeitraum. Bei 3 Patienten ist die Methotrexatausscheidung im selben Zeitraum bis auf 1/3 beschleunigt (Tab. 4).

4.1.4. Patienten mit Medulloblastom - Blutspiegelbestimmung

Diese Patientengruppe erhielt Methotrexat in einer Dosis von 700 mg/m^2 als Infusion über 24 Stunden; 10 % der Medikamentendosis wurden vor Infusionsbeginn als Bolus intravenös gegeben. Die Pharmakokinetik dieses Dosisbereiches ist in Abb. 10 dargestellt. Ausgewertet werden konnten 26 Behandlungszyklen, die bei 6 Patienten durchgeführt wurden. Zur Erstellung des Normbereiches wurden 15 Zyklen nach den gleichen hämatologischen Kriterien, wie sie bei Patienten mit Leukämie in Remission angewendet wurden, herangezogen (Tab. 5). Ebenso erfolgte die Definition des Normbereiches durch die 5. und 95. Percentile. Abb. 11 stellt die Medianwerte der Methotrexat-Plasmakonzentration nach unterschiedlichen Dosen - 150 mg/m^2 , 500 mg/m^2 , 700 mg/m^2 - zu verschiedenen Zeitpunkten vergleichend dar. Für eine Methotrexatdosis von 500 mg/m^2 waren die während der Infusion und 24 Stunden nach Ende der Infusion gemessenen Plasmakonzentrationen des Medikamentes signifikant ($2p < 0,02$) höher gegenüber einer Dosis von 150 mg/m^2 Methotrexat. Ein signifikanter Unterschied in den Plasmakonzentrationen von Methotrexat nach 24-stündiger Infusion von 500 mg/m^2 bzw. 700 mg/m^2 dieses Medikamentes konnte zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

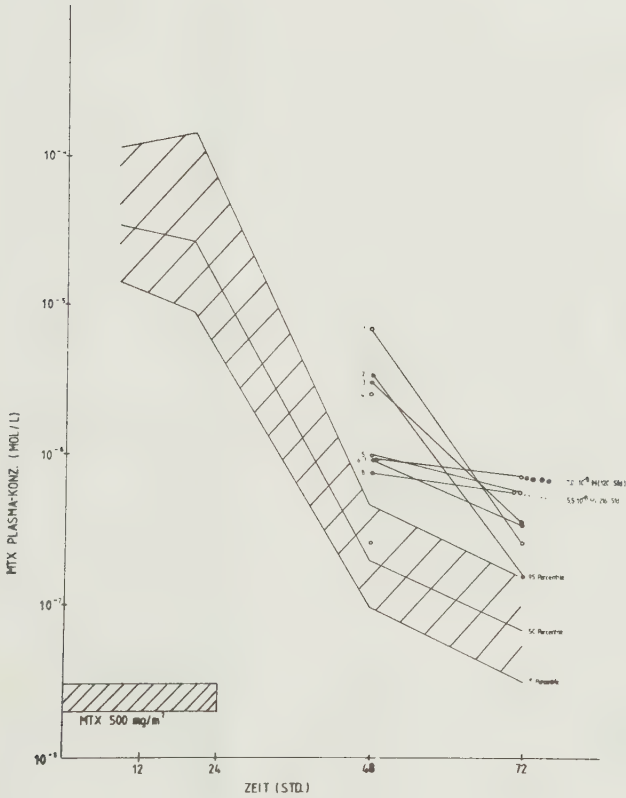


Abbildung 9:

Zyklen mit verzögerter MTX-Elimination nach mittelhochdosierter MTX-Therapie bei Patienten mit ALL im Rezidiv im Vergleich zum Normbereich (siehe auch Tab. 4 und 12).

Zeit	Anzahl der MTX- Bestimmungen	MTX-Plasmakonzentration (mol/l) Perzentilen		
		5.	50.	95.
12 Stunden	19	$4,6 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-4}$
Infusionsende	22	$4,4 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$9,2 \times 10^{-5}$
24 Std. später	26	$3,0 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-7}$
48 Std. später	18	$2,5 \times 10^{-8}$	$7,0 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-7}$

Tabelle 5:

Methotrexat-Plasmakonzentrationen während und nach einer Infusion von 700 mg/m^2 Methotrexat über 24 Stunden bei Medulloblastom (siehe auch Abb. 11).

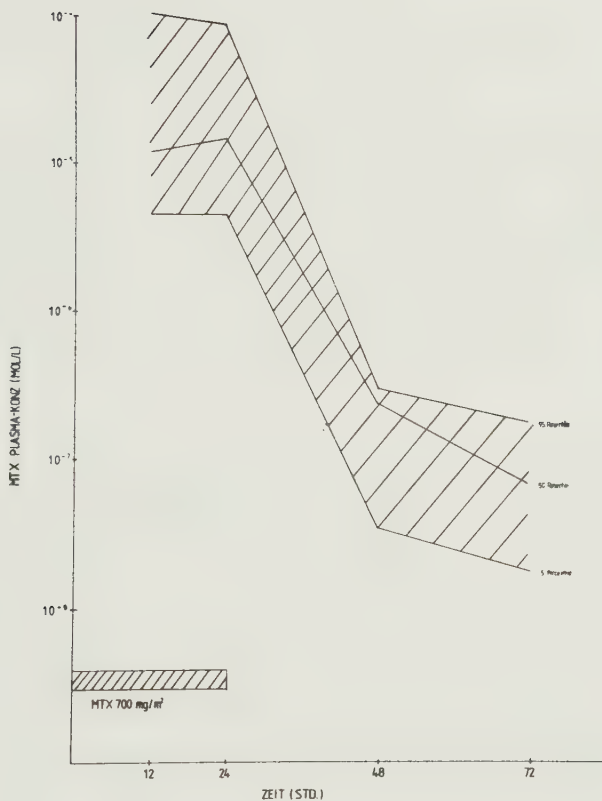


Abbildung 10:

MTX-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit Medulloblastom während und nach einer 24-stündigen mittelhochdosierten MTX-Infusion mit 700 mg/m² (siehe auch Tab. 5).

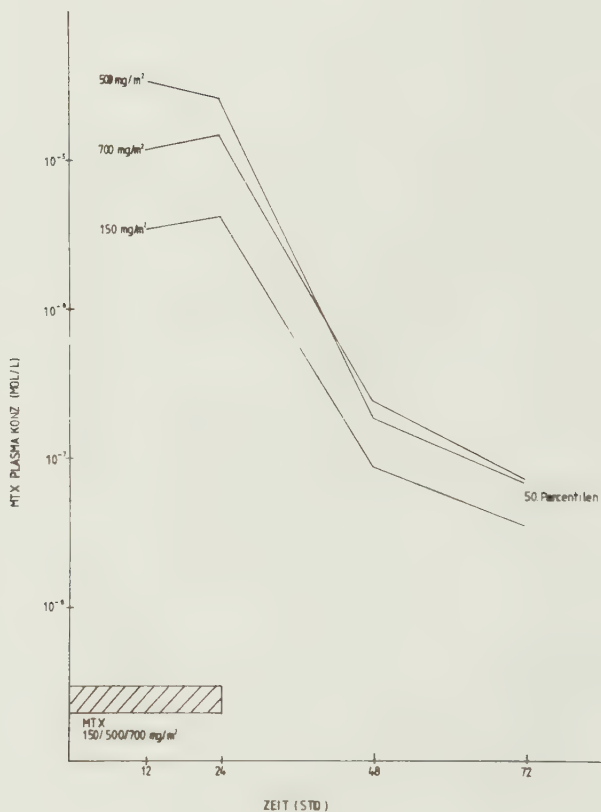


Abbildung 11:

MTX-Plasmakonzentration bei Patienten mit ALL in Remission und mit Medulloblastom während und nach einer 24-Stunden MTX-Infusion mit verschiedenen Dosen, dargestellt durch die 50. Perzentile.

4.1.5. Bestimmung der Liquorspiegel

4.1.5.1. Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie in Remission; Methotrexatdosis 150 mg/m^2 und 500 mg/m^2

Bei 10 Patienten, die mit einer Methotrexat-Dosis von 150 mg/m^2 über 24 Stunden infundiert wurden, erfolgte zusätzlich zur Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentration die Bestimmung der Liquorkonzentration dieses Medikamentes am Ende der Infusion. Die im Liquor gemessenen Methotrexatkonzentrationen lagen zwischen $2,4 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ und $1,9 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ (Median $5,1 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$; Tab. 6). Somit wurde bei keinem Patienten ein therapeutischer Liquorspiegel von über $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ erreicht.

Bei 4 Patienten, die im Rahmen ihrer Therapie 500 mg/m^2 Methotrexat als 24-Stunden-Infusion erhielten, wurden in 25 Behandlungszyklen am Ende der Infusion neben den Methotrexat-Plasmakonzentrationen auch die Methotrexat-Liquorkonzentrationen gemessen. Die Liquorkonzentrationen lagen zwischen $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ und $5 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ (Tab. 7). Bei 5/25 Zyklen lag die Liquorkonzentration im therapeutischen Bereich über dem kritischen Schwellenwert von $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$. Bei 2 Therapiezyklen wurden im Liquor Methotrexatkonzentrationen gemessen, die die Plasmakonzentration überschritten; gleiche Konzentrationen von Methotrexat im Liquor und Plasma wurden in keinem Zyklus gemessen.

4.1.5.2. Patienten mit Medulloblastom

Am Ende einer Methotrexatinfusion mit 700 mg/m^2 wurden Liquorkonzentrationen zwischen $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ und $1,9 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ gemessen (Tab. 8). Die mediane Methotrexatkonzentration unterschied sich mit $4,5 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ nur wenig von der medianen Liquorkonzentration von $3,8 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ nach 500 mg/m^2 .

Patient	MTX-Plasma- konzentration (mol/l)	MTX-Liquor- konzentration (mol/l)	Liquorkonzentration in % der Serum- konzentration
M.F.	$4,4 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-8}$	8,2
B.B.	$5,7 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-7}$	3,3
S.D.	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-7}$	1,5
D.H.	$2,4 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-8}$	1,0
A.J.	$2,8 \times 10^{-8}$	$3,3 \times 10^{-8}$	1,2
T.L.	$5,3 \times 10^{-8}$	$5,3 \times 10^{-8}$	1,0
A.M.	$4,8 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-8}$	10,4
A.P.	$9,6 \times 10^{-6}$	$8,8 \times 10^{-8}$	0,9
J.P.	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-7}$	10,8
J.S.	$4,8 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-8}$	0,6
Median	$3,8 \times 10^{-6}$	$5,1 \times 10^{-8}$	1,3

Tabelle 6:

Methotrexat-Plasma- und Liquorkonzentrationen bei 10 Patienten mit ALL in Remission am Ende einer 24-stündigen Infusion mit 150 mg/m^2 Methotrexat.

Patient	MTX-Plasma- konzentration (mol/l)	MTX-Liquor- konzentration (mol/l)	Liquorkonzentration in % der Serum- konzentration
M.M.	$8,4 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-7}$	4,5
A.O.	$3,7 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-6}$	11,4
	$3,4 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-7}$	5,6
J.J.	$2,6 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-7}$	14,6
	$6,4 \times 10^{-6}$	$5,3 \times 10^{-7}$	8,3
	$1,6 \times 10^{-6}$	$5,5 \times 10^{-7}$	34,4
	$4,4 \times 10^{-6}$	$7,0 \times 10^{-7}$	15,9
	$4,8 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	250,0
	$2,0 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-7}$	3,8
	$9,0 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-5}$	277,8
	$1,9 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-6}$	21,1
	$4,5 \times 10^{-6}$	$5,3 \times 10^{-7}$	11,8
	$3,0 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-7}$	1,9
M.U.	$6,6 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-7}$	4,4
	$3,4 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-8}$	1,5
	$1,8 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-6}$	8,3
	$3,1 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-7}$	9,0
	$4,9 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-7}$	4,3
	$8,9 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-7}$	4,4
	$7,6 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-7}$	4,6
	$1,6 \times 10^{-5}$	$3,5 \times 10^{-7}$	2,2
	$1,2 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-7}$	3,1
	$1,2 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-7}$	3,5
	$3,3 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-7}$	9,1
	$3,8 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-7}$	0,9
Median	$7,6 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-7}$	5,6

Tabelle 7:

MTX-Plasma- und Liquorkonzentrationen bei 4 Patienten mit ALL
am Ende einer 24-stündigen Infusion mit 500 mg/m^2 MTX
17 Zyklen zwischen 1 und 10 % der Plasmakonzentration
6 Zyklen zwischen 11 und 40 % der Plasmakonzentration
2 Zyklen über Plasmakonzentration

Patient	MTX-Plasma- konzentration (mol/l)	MTX-Liquor- konzentration (mol/l)	Liquorkonzentration in % der Serum- konzentration
F.V.	$2,1 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-6}$	12,4
	$2,8 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-6}$	10,4
	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-6}$	25,0
A.K.	$9,0 \times 10^{-6}$	$4,5 \times 10^{-7}$	5,0
	$2,2 \times 10^{-6}$	$4,3 \times 10^{-7}$	19,5
	$1,2 \times 10^{-5}$	$3,8 \times 10^{-7}$	3,2
H.S.	$4,6 \times 10^{-6}$	$8,5 \times 10^{-7}$	18,5
E.M.	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-6}$	2,0
	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-7}$	1,6
B.S.	$1,3 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-7}$	3,1
	$4,4 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-7}$	1,3
Median	$1,0 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-7}$	5,0

Tabelle 8:

Methotrexat-Plasma- und Liquorkonzentrationen bei 5 Patienten mit Medulloblastom am Ende einer 24-stündigen Infusion mit 700 mg/m^2 Methotrexat.

4.1.6. Relation der Blut-Liquorspiegel bei Leukämien und Medulloblastom

Das Verhältnis der Methotrexatkonzentrationen in Blut und Liquor bei simultaner Abnahme am Ende einer 24-Stunden-Infusion mit verschiedenen MTX-Dosen ist in den Tabellen 6, 7 und 8 dargestellt. Bei einer Dosis von 150 mg/m^2 betrug die MTX-Konzentration im Liquor 0,6 - 10,8 % (median 1,3 %) der Plasmakonzentration (Tab. 6).

Bei einer Dosis von 500 mg/m^2 fand sich eine starke Streuung des prozentualen Methotrexatanteils im Liquor (Tab. 7). Die Mehrzahl der Zyklen (17/25) wies eine Methotrexat-Liquorkonzentration zwischen 1 % und 10 % der Plasmakonzentration auf. Bei 6 Zyklen lagen die gemessenen Liquorkonzentrationen zwischen 8 % und 40 % der Plasmakonzentrationen. Bei 2 Zyklen überstieg die Methotrexatkonzentration im Liquor die Plasmakonzentration deutlich; die gemessenen Liquorkonzentrationen lagen um 250 % und 278 % über den zum gleichen Zeitpunkt gemessenen Serumkonzentrationen von Methotrexat. In keinem Zyklus entsprachen sich Liquorkonzentration und Plasmakonzentration. Der Medianwert des prozentualen Methotrexatanteils im Liquor für alle Zyklen betrug 5,6%. 22 von insgesamt 25 ausgewerteten Therapiezyklen wurden bei zwei Patienten mit ZNS-Leukämie durchgeführt, die Methotrexat als Infusion über 24 Stunden sowie intrathekal erhielten; der Abstand zwischen 2 Behandlungszyklen betrug 4 - 6 Wochen (siehe auch Patienten- und Therapieprotokolle S. 18). Bei einer Methotrexatdosis von 700 mg/m^2 , die bei Patienten mit Medulloblastom zur Anwendung kam, betrugen die im Liquor gemessenen Konzentrationen 1 % bis 25 % der zum gleichen Zeitpunkt gemessenen Plasmakonzentration. Der Medianwert des prozentualen Methotrexatanteils im Liquor betrug 5 % (Tab. 8). Alle Patienten mit Liquorkonzentrationen über 10 % der Plasmakonzentration hatten entweder einen spinalen Befall des Medulloblastoms (F.V., E.M.) oder waren kurz zuvor operiert (H.S.) oder bestrahlt (A.K.) worden (Tab. 8).

4.1.7. Vergleich der Pharmakokinetik bei verschiedenen Dosen einer mittelhochdosierten Methotrexattherapie

Betrachtet man den Abfall der Methotrexat-Plasmakonzentration nach verschiedenen hohen Dosierungen (150 mg/m^2 , 500 mg/m^2 , 700 mg/m^2) am Ende einer 24-Stunden-Infusion, so zeigt sich, daß innerhalb der ersten 24 Stunden nach Therapieende trotz unterschiedlicher Endkonzentrationen die Methotrexatelimination annähernd gleich schnell erfolgt (Abb. 11). Somit folgt der Abfall der Methotrexat-Plasmakonzentration einer Kinetik erster Ordnung. Die Halbwertszeiten, die während der Elimination nach Infusionsende bei verschiedenen mittelhohen MTX-Dosen erreicht werden, sind sowohl für den Zeitraum 'Infusionsende - 24 Stunden', als auch für die Zeitspanne '24 Stunden - 48 Stunden' nahezu identisch (siehe Tab. 3, Seite 28).

4.2. Toxizität

4.2.1. Leukämien in Remission

4.2.1.1. Hämatologische Toxizität

Bei 31 Patienten mit Leukämie in Remission wurden 92 Behandlungszyklen mit einer MTX-Dosis von 500 mg/m^2 durchgeführt. 71 Zyklen (77 %) verliefen ohne hämatologische Toxizität (Leukozytenabfall nicht unter $1.000/\text{mm}^3$, Thrombozytenabfall nicht unter $100.000/\text{mm}^3$). Bei 21 Zyklen (23 %) kam es zu einem - allerdings schnell reversiblen - Abfall der Leukozyten und/oder der Thrombozyten (Tab. 9). Der niedrigste Leukozytenwert lag bei $300/\text{mm}^3$ (median $700/\text{mm}^3$), als niedrigster Thrombozytenwert wurden bei einem Patienten $24.000 \text{ Thrombozyten/mm}^3$ (median $50.000/\text{mm}^3$) gezählt. Infektiöse Komplikationen milder Art, die sich meist nur als vorübergehender Fieberanstieg bemerkbar machten, traten bei 4 Zyklen im Gefolge einer Leukopenie auf. Bei 8 Behandlungszyklen traten diese Komplikationen auf, ohne mit einem gleichzeitigen Abfall der Leukozyten unter $1.000/\text{mm}^3$ vergesellschaftet zu sein. Bei Zyklen mit und ohne hämatologische Toxizität lagen die MTX-Konzentrationen im gleichen Bereich (oberster gemessener Wert $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$). Es muß

Leukozyten < 1.000/ μ l	Thrombozyten < 100.000/ μ l	Stomatitis	Exanthem
5/92 (6 %)	16/92 (17 %)	12/92 (13 %)	3/92 (3 %)

Tabelle 9:

Toxizität nach Infusion von 500 mg/m² Methotrexat über 24 Stunden bei ALL in Remission.

also mit dem angewendeten Therapieprotokoll auch bei normaler Methotrexatausscheidung in 23 % aller Behandlungsfälle mit einem hämatologisch milden toxischen Verlauf gerechnet werden. In 13 % der Behandlungszyklen wurde eine mäßige Stomatitis beobachtet. Ein Exanthem, das innerhalb zwei Tagen nach Behandlung auftrat, konnte dreimal beobachtet werden. Neurologische Komplikationen traten nicht auf.

Bei einer Methotrexatdosis von 150 mg/m^2 kam es bei 3/17 zu einem Abfall der Thrombozyten unter $100.000/\text{mm}^3$, hingegen wurde keine Leukopenie unter $1.000/\text{mm}^3$ beobachtet.

4.2.1.2. Hepatotoxizität

Der Anstieg der Leberenzyme SGOT und SGPT nach einer Infusion von 500 mg/m^2 Methotrexat ist in Tabelle 10 dargestellt. 78 % aller Zyklen wiesen einen Anstieg der Transaminasen auf, der bei 30 % der Zyklen den Wert von 100 I.E. für SGOT und/oder SGPT überstieg; absolut gesehen war ein Anstieg der Transaminasen über 100 I.E. bei 17 Zyklen festzustellen. Eine Bestimmung der Transaminasen wurde in 58/92 Therapiezyklen bei Patienten mit ALL in Remission durchgeführt. 4/17 Zyklen, die einen Transaminasenanstieg über 100 I.E. aufwiesen, waren auch mit hämatologischer Toxizität korreliert. In einem dieser 4 Zyklen wurde auch eine erhöhte Methotrexatkonzentration 24 Stunden nach Beendigung der Infusionstherapie gefunden; mit $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ entspricht dieser Wert der höchsten Methotrexatkonzentration, die bei Patienten mit ALL in Remission gemessen wurde. Die Methotrexatkonzentrationen 24 Stunden nach Therapieende in den übrigen Therapiezyklen lagen nicht über der 95. Percentile, entsprechend einer Methotrexatkonzentration von $4,3 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$.

Bei einer Patientin (A.G.) betrug das Verhältnis SGOT/SGPT vor Beginn einer 24-Stunden-Infusion mit $500 \text{ mg Methotrexat/m}^2$ 9 I.E./14 I.E.; drei Tage nach Infusionsende war die SGOT auf 179 I.E., die SGPT auf 445 I.E. angestiegen; dies entspricht dem höchsten, bei Patienten mit ALL in Remission gemessenen Transaminasenanstieg. 14 Tage nach Beendigung der Infusionsbehandlung waren die Werte für SGOT und SGPT in

Transaminasen SGOT/SGPT (I.E./l)	Methotrexatdosis 500 mg/m ² ALL in Remission n = 58 Zyklen	ALL im Rezidiv N = 25 Zyklen
V 30	13 (22 %)	11 (44 %)
31 - 60	21 (36 %)	6 (24 %)
61 - 100	7 (12 %)	4 (16 %)
101 - 200	7 (12 %)	1 (4 %)
V 200	10 (18 %)	3 (12 %)

Tabelle 10:

Anstieg der Serumtransaminasen als Ausdruck der Lebertoxizität bei Patienten mit ALL in Remission und ALL im Rezidiv nach einer 24-stündigen Infusion mit 500 mg/m² Methotrexat.

den Normbereich zurückgekehrt. Bei der Patientin trat keine hämatologische Toxizität auf, ebenso wurden weder eine Stomatitis, noch ein Exanthem noch neurologische Komplikationen beobachtet. Die 24 Stunden nach Infusionsende gemessene Methotrexatkonzentration entsprach mit $4,3 \times 10^{-7}$ mol/l der 95. Perzentile.

4.2.1.3 Nierentoxizität

Um zu prüfen, ob ein Anstieg des Serumkreatinin über 50 % des Ausgangswertes Rückschlüsse auf eine verzögerte Methotrexatelimination zuläßt, wurde bei 44 Behandlungszyklen - durchgeführt bei Patienten mit ALL in Remission - untersucht, ob bei einer verzögerten Methotrexatelimination (48-Stundenwert über $4,3 \times 10^{-7}$ mol/l) eine Erhöhung des Serumkreatinins über 50 % des Ausgangswertes auftrat. Tabelle 11 zeigt den Anstieg des Serumkreatinin bei Patienten mit ALL in Remission nach einer 24-Stunden-Infusion von 500 mg/m^2 Methotrexat.

Lediglich bei 3/44 Zyklen stieg das Serumkreatinin über 50 % des Ausgangswertes, wobei die Methotrexat-Plasmakonzentrationen 24 Stunden nach Infusionsende deutlich unter $4,3 \times 10^{-7}$ mol/l lagen. In den Fällen, in denen die Methotrexat-Plasmakonzentration 24 Stunden nach Infusionsende über der 95. Perzentile lag, kam es zu keiner Erhöhung des Serumkreatinins über 50 % des Ausgangswertes. Somit läßt ein Kreatininanstieg über 50 % des Ausgangswertes keine Folgerung auf eine verzögerte Methotrexatausscheidung zu.

4.2.2. Leukämien im Rezidiv

4.2.2.1. Hämatologische Toxizität

Sind die toxischen Erscheinungen bei Patienten mit ALL in Remission eher milder Natur, so kommt es bei Patienten mit ALL im Rezidiv nach einer Infusion von 500 mg/m^2 Methotrexat zu einer Reihe schwerer Begleiterscheinungen, die vorwiegend Haut, Schleimhäute und vor allem das Knochenmark betreffen. Ein Leukozyten- und/oder Thrombozytenabfall

Kreatininanstieg 24 - 48 Stunden nach Infusionsende	MTX-Dosis 500 mg/m ²	
	ALL in Remission n = 44 Zyklen	ALL im Rezidiv n = 24 Zyklen
< 50 %	41 (93 %)	22 (92 %)
> 50 %	3 (7 %)	2 (8 %)

Tabelle 11:

Anstieg des Serumkreatinins als Ausdruck der Nephrotoxizität bei Patienten mit ALL in Remission und ALL im Rezidiv nach einer 24-stündigen Infusion mit 500 mg/m² Methotrexat.

als Kriterium für die hämatologische Toxizität von MTX kann bei ALL im Rezidiv nur eingeschränkt verwendet werden; viele Rezidivpatienten, deren Behandlungsergebnisse in dieser Arbeit dargestellt werden, wiesen als Folge des Rezidivs bereits bei Behandlungsbeginn Leukozytenzahlen unter $1.000/\text{mm}^3$ und Thrombozytenzahlen unter $100.000/\text{mm}^3$ auf. Als Parameter für die Beurteilung der Toxizität bei Rezidivpatienten wurde das Auftreten eines schwer verlaufenden Exanthems, einer schweren Stomatitis, vor allen Dingen aber die Dauer der Knochenmarksdepression zu Grunde gelegt. Diesen Kriterien entsprechend waren die Verläufe bei 6/9 Patienten als schwer toxisch zu bezeichnen (Tab. 12). Bei 5/6 Patienten, die schwere toxische Verläufe aufwiesen, lag die MTX-Konzentration 24 Stunden nach Infusionsende über $5 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$, dem höchsten Wert, der zu diesem Zeitpunkt bei Patienten mit ALL in Remission gemessen wurde (Abb. 9). Ein Patient (T.W.) mit schwerem toxischen Verlauf wies 24 Stunden nach Infusionsende mit $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ eine normale Methotrexat-Plasmakonzentration auf.

Bei allen 5 Therapiezyklen waren die Halbwertszeiten des Methotrexat teilweise erheblich verlängert (Tab. 4). Diese Verlängerung betrifft bei 4 Zyklen (Patient 1, 4, 5, 6) die 1. Halbwertszeit zwischen Infusionsende und 24 Stunden später, sowie bei 3 Zyklen (Patient 5, 6, 8) die 2. Halbwertszeit zwischen 24 - 48 Stunden. Die 1. Halbwertszeit war auf maximal 11 Stunden verlängert (normal 3 - 4 Stunden) und die 2. Halbwertszeit auf maximal 36 Stunden (normal 16 Stunden). Bei 2 Patienten (R.H., A.R.) wurden noch 5 bzw. 9 Tage nach Beendigung der Infusion Methotrexatkonzentrationen von $7,0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ (A.R.) bzw. $5,5 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ (R.H.) gemessen (Abb. 9). Bei 2 Patienten trat im Verlauf der schweren Knochenmarksdepression eine lebensbedrohliche Sepsis auf. Bei 4 Patienten ging ein während der Behandlung aufgetretenes Exanthem in Schuppung und Blasenbildung über. 2 Patienten entwickelten einen massiven Pleuraerguß. 3 Zyklen (Patient 2, 3, 7), bei denen die Methotrexat-Plasmakonzentration 24 Stunden nach Infusionsende über $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ lagen, waren nur mit geringer Toxizität verbunden (Tab. 12). Die Halbwertszeiten des Methotrexat zeigten in diesen 3 Zyklen ein unterschiedliches Verhalten; bei 2 Zyklen (Patient 2, 3) war die 1. Halbwertszeit mit 20 bzw. 5 Stunden teilweise deutlich

Patient	Toxizität	MTX-Konzentration (mol/l)		Leukozyten- tiefpunkt /μl	Thrombozyten- tiefpunkt /μl	Starkes Exanthem	Schwere Stomatitis
1 M.S.	schwer	6,8 x 10 ⁻⁶	2,5 x 10 ⁻⁷	50	5.000	+	+
2 M.F.	mäßig	3,3 x 10 ⁻⁶	1,5 x 10 ⁻⁷	1.400	84.000	-	-
3. U.P.	mäßig	3,0 x 10 ⁻⁶	3,5 x 10 ⁻⁷	2.200	26.000	-	-
4. R.J.	schwer	2,5 x 10 ⁻⁶	-	900	30.000	+	+
5 R.H.	schwer	9,8 x 10 ⁻⁷	5,5 x 10 ⁻⁷	300	18.000	+	+
6 A.R.	schwer	9,5 x 10 ⁻⁷	7,0 x 10 ⁻⁷	100	4.000	+	+
7 M.F.	mäßig	9,3 x 10 ⁻⁷	3,4 x 10 ⁻⁷	350	25.000	-	-
8 E.S.	schwer	7,3 x 10 ⁻⁷	5,5 x 10 ⁻⁷	350	10.000	+	+
9 T.W.	schwer	2,5 x 10 ⁻⁷	-	50	10.000	+	+

Tabelle 12:

Mittelhochdosierte Methotrexat-Therapie (500 mg/m²) bei Patienten mit ALL im Rezidiv: Zyklen mit erhöhter Plasmakonzentration 24 Stunden nach Infusionsende; 1 Zyklus (Pat. 9) mit schwerer Toxizität ohne erhöhten Methotrexat-Spiegel.

verlängert, die 2. Halbwertszeit aber mit 6 bzw. 8 Stunden um mindestens die Hälfte gegenüber der Norm verkürzt. Beim 3. Zyklus mit geringer Toxizität (Patient 7) wichen die Halbwertszeiten des Methotrexat nur geringfügig von der normalen mittleren Halbwertszeit ab (Tab. 4).

4.2.2.2. Hepatotoxizität

Tabelle 10 zeigt den Anstieg der Transaminasen bei Patienten mit ALL im Rezidiv nach einer 24-Stunden-Infusion von 500 mg/m² Methotrexat. 56 % der Zyklen zeigten einen Transaminasenanstieg, der jedoch nur bei 16 % der Zyklen den Wert 100 I.E. überstieg.

Das Verteilungsmuster des Anstiegs von SGOT und SGPT nach mittelhochdosierter Methotrexatbehandlung läßt auch bei Patienten mit ALL im Rezidiv keinen Schluß auf die systemische Toxizität von Methotrexat zu. Von den 5 Patienten, die einen schweren toxischen Verlauf bei erhöhter Methotrexat-Plasmakonzentration zeigten, wies nur 1 Patient für SGOT und SGPT Werte auf, die 100 I.E. überstiegen. Der Patient (T.W.), der trotz normaler Methotrexat-Plasmakonzentration einen schwer toxischen Verlauf zeigte, wies durchweg nur geringe Erhöhungen von SGOT und SGPT auf, die unter 30 I.E. lagen.

4.2.2.3. Nierentoxizität

Eine Erhöhung des Serumkreatinins auf über 50 % des Ausgangswertes wurde bei 2 Patienten mit ALL im Rezidiv beobachtet (Tab. 11). Diese beiden Patienten wiesen normale Methotrexat-Plasmakonzentrationen 24 Stunden nach Infusionsende auf. Bei den Patienten mit verzögerter Methotrexatausscheidung war nur ein geringer Anstieg des Serumkreatinins messbar. Somit liegt der Schluß nahe, daß auch bei Patienten mit ALL im Rezidiv eine Erhöhung des Serumkreatinins auf über 50 % des Ausgangswertes nicht mit einer verzögerten Methotrexatausscheidung einhergehen muß.

4.2.3. Medulloblastom

Im Rahmen der Therapie des Medulloblastoms wurde Methotrexat als sogenannte "adjuvante Chemotherapie" angewandt (siehe Patienten- und Therapieprotokolle Seite 18). Da mit Vincristin ein weiteres zytostatisches Medikament gegeben wurde, kann der hämatologisch-toxische Effekt von Methotrexat nicht mit ausreichender Sicherheit beurteilt werden. Bei 5/26 Zyklen wurde ein Leukozytenabfall unter $1.000/\text{mm}^3$ und/oder ein Thrombozytenabfall unter $100.000/\text{mm}^3$ beobachtet. Eine Bestimmung der Leberenzyme SGOT und SGPT erfolgte nur in wenigen Fällen, ebenso wurde das Verhalten des Kreatininspiegels im Serum nur in wenigen Zyklen untersucht. Neurotoxische Erscheinungen, die auf die Anwendung von Methotrexat zurückzuführen gewesen wären, traten in keinem Fall auf.

4.3. Klinische Ergebnisse

4.3.1. Leukämien in Remission

Von 104 Patienten, die in das Protokoll ALL 77-01 aufgenommen wurden, waren 86 Kinder für eine komplette Remissionsdauer beurteilbar. Für Patienten, die bei Diagnosestellung Leukozytenzahlen unter $25.000/\text{mm}^3$ aufwiesen, betrug die Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden Remission über 70 % (33). Dem gegenüber sprachen Patienten mit Leukozytenzahlen über $25.000/\text{mm}^3$ oder T-Zell-Marken relativ schlecht auf die Therapie an. Das Remissionsniveau lag nach 36 Monaten bei 48 % (33).

101 Patienten, die entsprechend dem Protokoll ALL 77-02 behandelt wurden, waren für die Dauer einer kompletten Remission beurteilbar. Für Nichtrisikopatienten betrug die Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden Remission nach 30 Monaten 98 %, für Risikopatienten 65 %. Das Remissionsniveau liegt somit deutlich höher als für Nichtrisikopatienten des Protokolles ALL 77-01 zum gleichen Zeitpunkt (34).

4.3.2. Leukämien im Rezidiv

8 Patienten erhielten Methotrexatinfusionen als Monotherapie. Von diesen Patienten erzielte einer eine Teilremission. Bei 7 Kindern erreichte man ein vorübergehendes Verschwinden der Leukämiezellen aus dem peripheren Blutbild, jedoch keine Knochenmarksremission.

7 Patienten erhielten Methotrexat in Kombination mit Asparaginase. Bei 3 dieser Kinder kam es zur Vollremission, bei 2 zu einer Teilremission. Bei 2 Patienten kam es zu einem einstweiligen Verschwinden der Leukämiezellen aus dem peripheren Blutbild, eine Knochenmarksremission trat jedoch nicht ein.

4.3.3. Medulloblastom

Von den 6 Patienten, die nach dem Protokoll MB 79 behandelt wurden, wiesen 3 bereits bei Aufnahme in die Studie ein Tumorrezidiv mit meningealer Aussaat auf. Bei diesen Patienten ließ sich durch die Therapie eine Besserung des Liquorbefundes erzielen, sie verstarben jedoch an ihrer Krankheit.

Von den restlichen 3 Patienten, bei denen das Protokoll nach der Operation zur Anwendung kam, verstarb einer am Tumorrezidiv. 2 Patienten sind rezidivfrei am Leben.

5. DISKUSSION

5.1. Pharmakokinetik

5.1.1. Normbereich der Methotrexat-Plasmakonzentration bei verschiedenen Dosen

Die Anwendung neuer Therapiekonzepte mit mittelhochdosierter Methotrexattherapie bei der Behandlung der ALL und des Medulloblastoms erfordert Kenntnisse über erreichbare Methotrexatkonzentrationen im Plasma sowie den Abfall der Methotrexat-Plasmakonzentration nach Beendigung der Therapie. Es sind Kenntnisse darüber erforderlich, ob ein verzögerter Abfall der Methotrexat-Plasmaspiegel nach Infusion verschiedener Dosen eine Aussage über das Auftreten toxischer Erscheinungen zuläßt. Schließlich sollte bekannt sein, über welchen Zeitraum Leukämie-wirksame bzw. Gewebe-toxische Methotrexat-Plasmaspiegel bestehen, um dadurch Dauer und Zeitpunkt der Leukovorintherapie vielleicht besser festlegen zu können. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin, jeweils einen Normbereich der Plasmakonzentrationen für mittelhochdosierte Methotrexatinfusionen von 150 mg/m^2 , 500 mg/m^2 und 700 mg/m^2 Körperoberfläche zu ermitteln und in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik die Toxizität des Methotrexat zu untersuchen. Der in der vorliegenden Arbeit gefundene Normbereich für eine Methotrexatdosis von 150 mg/m^2 umfaßt zwischen der 5. und 95. Perzentile einen Konzentrationsbereich von $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ bis $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ während einer 24-stündigen Infusion (Abb. 5; Tab. 1). Mit dieser Dosis wurde somit die von den Autoren des Protokolls 77-01 angestrebte Methotrexat-Plasmakonzentration von $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ erreicht (33). 24 bzw. 48 Stunden nach Beendigung der Infusion betrugen die mittleren Serumkonzentrationen $8,8 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ bzw. $4,5 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$; diese waren damit nicht mehr Leukämie-wirksam. Eine 24-Stunden-Infusion wurde gewählt, um einen möglichst großen Anteil maligner Zellen in der empfindlichen S-Phase wirksamen Methotrexatkonzentrationen auszusetzen.

10 % der Gesamtdosis von 150 mg/m^2 wurden als Bolus intravenös vorgespritzt um die wirksame Plasmakonzentration von $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$

möglichst schnell zu erreichen. Ohne Bolusinjektion stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht im Plasma erst nach über 12 Stunden ein (24). Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, stellt sich dieses Konzentrationsgleichgewicht nach 1 Stunde ein, wenn 10 % der Gesamtdosis vorgespritzt werden.

Pharmakokinetische Daten über 24-Stunden-Infusionen von 150 mg/m^2 Methotrexat fehlen bisher in der Literatur. Anhand der vorliegenden Daten läßt sich jedoch eindeutig zeigen, daß mit dieser Dosierung ausreichende, Leukämie-wirksame Methotrexat-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit ALL in Remission erzielt werden.

Bei Gabe von 500 mg/m^2 Methotrexat ergaben sich signifikant höhere Plasmakonzentrationen während der Infusion und 24 Stunden später im Vergleich zu einer Dosis von 150 mg/m^2 (Abb. 11). Im Mittel wurde eine Methotrexat-Plasmakonzentration von $2,6 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ erreicht. Diese war somit ausreichend hoch, um Methotrexat auch durch passive Diffusion in die Zelle gelangen zu lassen, wenn der aktive, durch "Carrier" vermittelte Transport in die Zelle unzureichend ist. Voraussetzung für diese passive Diffusion ist eine extrazelluläre kritische Methotrexat-konzentration von $2 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ (43; 69).

In der Literatur gibt es bisher nur spärliche Daten über die Pharmakokinetik einer 24-Stunden-Infusion mit 500 mg/m^2 Methotrexat!

Wang (68) gibt als mittlere, während der Infusionsdauer erreichte Methotrexat-Plasmakonzentration den Bereich von 10^{-5} mol/l an, Shapiro (60) ermittelte eine mittlere Konzentration von $2 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$, Rechnitzer (55) schließlich gibt als mittlere Methotrexatkonzentration für eine Dosis von 500 mg/m^2 einen Wert von $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ an, der während einer 24-Stunden-Infusion erreicht wird.

Unsere Ergebnisse untermauern somit die spärlichen, bisher vorliegenden Literaturdaten.

Eine Erhöhung der Methotrexatdosis auf 700 mg/m^2 ergab zu keinem Zeitpunkt signifikant höhere Methotrexat-Plasmakonzentrationen im Ver-

gleich zu einer Dosis von 500 mg/m^2 (Abb. 11). Das könnte damit zusammenhängen, daß Methotrexat zu 95 % an Plasmaproteine gebunden ist und dieser gebundene Anteil bei einer Methotrexat-Plasmakonzentration zwischen $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ und $3 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ konstant bleibt (63). Ebenso könnte dieser über weite Strecken konstante Prozentsatz der proteingebundenen Methotrexatfraktion eine Erklärung für die praktisch identischen Halbwertszeiten sein, innerhalb derer die Methotrexat-Plasmakonzentration bei verschiedenen Dosen im mittelhochdosierten Bereich nach einer 24-Stunden-Infusion abnimmt (Tab. 3).

5.1.2. Relation der Blut-Liquorspiegel

Bei Patienten mit ALL in Remission und Medulloblastom wurden während einer 24-Stunden-Infusion mit 150 mg/m^2 , 500 mg/m^2 und 750 mg/m^2 MTX-Liquorkonzentrationen dieses Medikamentes gemessen, die 1 - 11 % der Plasmakonzentration betrugen. Die für die Behandlung eines meningealen Befalles notwendige Liquorkonzentration von $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ wurde mit einer MTX-Dosis von 150 mg/m^2 in keinem Fall erreicht (Tab. 6); mit einer Dosis von 500 mg/m^2 wurden in 5/25 Fällen Liquorkonzentrationen über $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ erreicht. Selbst bei Infusionen von 700 mg/m^2 Methotrexat wurde nur in 4/11 Zyklen eine Liquorkonzentration dieses Medikamentes über $1 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ erreicht.

Diese niedrigen, therapeutisch unwirksamen Liquorkonzentrationen bei der mittelhochdosierten, intravenösen Methotrexatbehandlung kommen durch die schlechte Liquorgängigkeit von Methotrexat zustande. Dieses ist bei physiologischem und saurem pH lipidunlöslich (45) und kann somit eine intakte Blut-Liquor-Schranke nur schlecht passieren.

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Anteil der Methotrexat-Liquorkonzentration an der Plasmakonzentration stimmt gut mit den von Shapiro (60) ermittelten Daten überein, der während einer 24-Stunden-Infusion von 500 mg/m^2 Methotrexat im Durchschnitt 3 % der Serumkonzentration im Liquor ermittelt. Wang (68) findet bei Serumkonzentrationen von 10^{-5} mol/l während einer 24-Stunden-Infusion von 500 mg/m^2 Methotrexat Liquorkonzentrationen, die im Mittel 1 % der Serumkonzentration entsprechen.

tration betragen. Rechnitzer (55) findet unter den gleichen Bedingungen eine Liquorkonzentration, die 0,7 % der Plasmakonzentration beträgt.

Diese 3 Autoren haben bisher pharmakokinetische Daten über eine mittelhochdosierte Methotrexattherapie mitgeteilt. Sie haben ihre Daten jedoch an relativ wenigen Patienten erhoben und wenig Behandlungszyklen ausgewertet.

Wang (68) : 42 Patienten, Anzahl der Behandlungszyklen nicht angegeben.

Shapiro (60) : 21 Patienten, 28 ausgewertete Behandlungszyklen.

Rechnitzer (55): 18 Patienten, 45 ausgewertete Behandlungszyklen.

Für eigene Untersuchungen konnten 179 Behandlungszyklen von 63 Patienten ausgewertet werden.

Überraschenderweise wies der prozentuale Anteil der MTX-Liquorkonzentration nach 24-Stunden-Infusion einer mittelhochdosierten Methotrexatdosis bei Patienten mit Medulloblastom und meningealer Aussaat der ALL erhebliche Schwankungen auf; bei 2 Zyklen überstieg die MTX-Liquorkonzentration die Plasmakonzentration um 250 % bzw. 280 %. Unerwartet hohe Methotrexatkonzentrationen im Liquor wurden nach intrathekalen (6) sowie intravenösen Anwendung (66) bei Leukämiepatienten mit meningealem Befall beschrieben. Als Ursache wären eine erhöhte Durchlässigkeit der "Blut-Liquor-Schranke" oder eine verzögerte Methotrexatelimination aus dem Liquor durch Befall der Hirnhäute mit Tumorzellen zu diskutieren.

5.2. Kriterien zur Vorhersage einer drohenden Methotrexattoxizität

5.2.1. 48-Stundenwert der Methotrexat-Plasmakonzentration

Ausgehend von der Überlegung, daß ein erhöhter MTX-Plasmaspiegel 24 Stunden nach Infusionsende auf eine verzögerte Methotrexatelimination

schließen läßt, wurde dieser Wert als wichtigstes Kriterium für das Auftreten toxischer Erscheinungen herangezogen.

Bei Patienten mit ALL in Remission muß nach den vorliegenden Ergebnissen bei 23 % aller Zyklen mit einer milden, rasch reversiblen, hämatologischen Toxizität, und in 13 % aller Behandlungszyklen mit Nebenwirkungen in Form einer Stomatitis oder eines Exanthems gerechnet werden. Entscheidend für uns war die Beobachtung, daß diese durchweg mäßig toxischen Auswirkungen unabhängig von der Methotrexat-Plasmakonzentration 48 Stunden nach Infusionsbeginn auftraten und daß eine MTX-Konzentration von $5,0 \times 10^{-7}$ mol/l zum selben Zeitpunkt nicht überschritten wurde.

Bei Patienten mit ALL im Rezidiv wurde dagegen in 8/44 Zyklen eine verzögerte Methotrexat-Ausscheidung gefunden. Von diesen 8 Zyklen waren 6 mit schwerer Toxizität vergesellschaftet. Die Methotrexat-Plasmakonzentration lag in 8/44 Fällen 48 Stunden nach Infusionsbeginn über $5,0 \times 10^{-7}$ mol/l (Abb. 9; Tab. 4) - der höchsten Konzentration also, die bei Patienten mit ALL in Remission zum gleichen Zeitpunkt gemessen wurde; in insgesamt 11/44 Zyklen wurde zu diesem Zeitpunkt die 95. Perzentile von $4,3 \times 10^{-7}$ mol/l überschritten.

Eine normale MTX-Ausscheidung, d. h. MTX-Plasmakonzentrationen im Normbereich 24 Stunden nach Ende einer Infusion, ist keine Garantie für einen atoxischen Verlauf bei Patienten mit ALL in Remission. Bei Patienten im Rezidiv trat in einem Fall mit normaler MTX-Elimination eine schwere Toxizität auf, so daß auch in Rezidivfällen ein 48-Stundenwert im Normbereich toxische Erscheinungen nicht ausschließt.

Aufgrund unserer Ergebnisse und der gewonnenen klinischen Erfahrung halten wir bei Patienten mit ALL in Remission nach einer 24-Stunden-Infusion von 500 mg/m^2 Methotrexat mit anschließender Leukovorin-Schutztherapie (siehe 5.6.) eine routinemäßige Bestimmung der MTX-Spiegel nicht für notwendig, es sei denn, daß die Patienten Risikofaktoren aufweisen, die auf eine verzögerte MTX-Elimination hinweisen; dazu gehören Infekte, Ergüsse, eingeschränkte Nierenfunktion.

Patienten mit ALL im Rezidiv weisen unserer Erfahrung nach in einem weit höheren Prozentsatz eine verzögerte MTX-Ausscheidung auf; diese ist aber dann immer mit dem Auftreten teilweise schwerer Toxizität verknüpft.

Unserer Meinung nach sollten bei Rezidivpatienten deshalb Messungen der MTX-Plasmakonzentration obligat durchgeführt werden, um eine drohende Toxizität rechtzeitig zu erfassen und die Leukovorin-Schutztherapie so effektiv wie möglich zu gestalten (siehe auch Punkt 5.6.).

5.3. Hämatologische Toxizität

Ein Leukozytenabfall unter $1.000/\text{mm}^3$ und/oder ein Thrombozytenabfall unter $100.000/\text{mm}^3$ trat bei einer Methotrexatdosis von 150 mg/m^2 in 3/17 Fällen auf. Es kam in allen 3 Fällen zu einer rasch reversiblen Thrombopenie; eine Leukopenie unter $1.000/\text{mm}^3$ wurde nicht beobachtet. Bei keinem dieser 3 Zyklen lag die Methotrexat-Plasmakonzentration am Ende einer 24-Stunden-Infusion und 24 Stunden später über der 95. Percentile.

Bei einer Methotrexatdosis von 500 mg/m^2 über 24 Stunden trat bei Patienten mit ALL in Remission in 23 % der Behandlungszyklen eine hämatologische Toxizität mit einem Leukozytenabfall unter $1.000/\text{mm}^3$ und/oder einem Thrombozytenabfall unter $100.000/\text{mm}^3$ auf. Diese Erscheinungen waren rasch reversibel und nur in einem Fall mit einer MTX-Plasmakonzentration über der 95. Percentile 24 Stunden nach Infusionsende verbunden. In allen anderen Zyklen mit hämatologischer Toxizität wurden MTX-Plasmakonzentrationen gemessen, die 24 Stunden nach Infusionsende unter der 95. Percentile von $4,3 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ lagen, bzw. diese Konzentration nicht überschritten; umgekehrt wurde die höchste MTX-Plasmakonzentration bei Remissionspatienten von $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ bei einem Patienten gemessen, der völlig normale Werte für Thrombozyten und Leukozyten aufwies (siehe auch Tab. 2 und Abb. 7).

Bei Patienten mit ALL im Rezidiv kann ein Leukozyten- und/oder Thrombozytenabfall nur mit Einschränkungen als Kriterium einer hämatologi-

schen Toxizität herangezogen werden (siehe 4.2.2.1.). Als entscheidender Parameter zur Beurteilung der Hämatotoxizität von Methotrexat wurde hier eine länger als 7 Tage anhaltende Knochenmarksdepression zugrunde gelegt. Eine verzögerte Methotrexatausscheidung war in 8/44 Fällen mit einer Thrombozytopenie unter $100.000/\text{mm}^3$ und in 6/44 Fällen mit einer Leukopenie unter $1.000/\text{mm}^3$ vergesellschaftet; andererseits wies ein Patient mit einer schweren Leukozyten- und Thrombozytendepression eine normale Methotrexatausscheidung auf (siehe Tab. 12 und Abb. 9).

Das Auftreten einer hämatologischen Toxizität war unabhängig von der Methotrexat-Plasmakonzentration; ein linearer Zusammenhang zwischen der Methotrexat-Plasmakonzentration, der verabreichten Dosis (150 mg/m^2 ; 500 mg/m^2) sowie der Leukozyten- und Thrombozytenzahl konnte nicht nachgewiesen werden.

Eine deutlich verzögerte MTX-Ausscheidung mit einer MTX-Plasmakonzentration von über $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ 24 Stunden nach Infusionsende war nur bei Patienten mit ALL im Rezidiv festzustellen; bei diesen Patienten kamen zur hämatologischen Toxizität gehäuft Komplikationen anderer Art, z. B. schwere Stomatitis oder ein schweres Exanthem hinzu.

Unseren Beobachtungen zufolge tritt eine hämatologische Toxizität primär unabhängig von der Methotrexat-Plasmakonzentration während der Infusion auf, schwere toxische Verläufe gehen aber gehäuft mit verzögerter MTX-Ausscheidung einher; andererseits werden schwere toxische Verläufe - insbesondere bei Patienten mit ALL im Rezidiv - auch bei normaler MTX-Elimination gefunden.

Damit stehen unsere Beobachtungen im Widerspruch zu Rechnitzer et al. (55). Diese Autorengruppe findet eine Methotrexatkonzentration über $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ 48 Stunden nach dem Ende einer 24-Stunden-Infusion von 500 mg/m^2 Methotrexat immer vergesellschaftet mit toxischen Erscheinungen z. T. schwerer Natur. In unseren Untersuchungen liegt diese MTX-Konzentration - zum selben Zeitpunkt gemessen - noch innerhalb unseres ermittelten Normbereiches für eine Methotrexat-Dosis von 500 mg/m^2 ; zudem kann eine Verbindung zwischen dieser Methotrexat-

Konzentration und dem damit vergesellschafteten Auftreten toxischer Erscheinungen bei Rechnitzer (55) in unserem Krankengut nicht festgestellt werden. Da Rechnitzer et al. (55) eine andere Leukovorin-Schutztherapie anwandten, nämlich einmalig 12 mg/m^2 48 Stunden nach Infusionsbeginn, könnte in diesem Vorgehen möglicherweise eine Erklärung für das Zustandekommen dieser Ergebnisse liegen. Bekanntlich wurden bei unseren Patienten 2 Dosen Leukovorin zu je 15 mg gegeben, und zwar 24 Stunden und 30 Stunden nach Infusionsende (siehe auch 5.6, S. 63).

Für die Vorhersage einer Methotrexattoxizität halten wir überdies den von Rechnitzer angegebenen Zeitpunkt - 72 Stunden nach Infusionsbeginn - für zu spät. Auch bei unseren Patienten traten - wie bei Rechnitzer (55) - schwere toxische Erscheinungen frühestens 5 Tage nach der Methotrexatbehandlung auf. Ebenso können wir die auch von Wang (68) gemachte Beobachtung bestätigen, daß toxische Komplikationen leichter Art bevorzugt bei Patienten mit ALL in Remission auftreten und schwere toxische Verläufe gehäuft bei Rezidivpatienten gesehen werden.

Aufgrund der eben angeführten Tatsachen ergibt sich jedoch unserer Meinung nach die Notwendigkeit, eine beginnende Methotrexattoxizität 24 Stunden früher, also bereits 48 Stunden nach Infusionsbeginn zu erfassen, um gezielte Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. Die einzig wirksame Maßnahme bei drohender Methotrexattoxizität ist die Variation der Leukovorin-Schutztherapie. Diese sollte einerseits nicht auf Verdacht unbegrenzt fortgeführt werden, andererseits ist es sinnlos, eine primär abgeschlossene Leukovorintherapie beim Auftreten schwerer toxischer Erscheinungen nach mehreren Tagen erneut zu beginnen, da die kritische Expositionsdauer für normales Gewebe längst überschritten ist (siehe 2.4, Seite 10 und 5.6, Seite 63).

5.4. Hepatotoxizität

Ein Transaminasenanstieg über 100 I.E. muß nicht gleichbedeutend mit hämatologisch-toxischen Erscheinungen sein, ebenso müssen die Methotrexatkonzentrationen den Normbereich nicht übersteigen. Die Bestim-

mung der SGOT und SGPT läßt also auch bei deutlichem Anstieg über 100 I.E. keinen Rückschluß auf das Ausmaß der systemischen Toxizität von Methotrexat zu.

Ein Zusammenhang zwischen der MTX-Plasmakonzentration, der verabreichten Dosis und der Enzymerhöhung konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Der Anstieg war individuell stark verschieden und folgte keinem vorhersehbaren Muster. Bei einigen Patienten wurde eine Erhöhung der Transaminasen nie beobachtet.

Vergleichende Untersuchungen von Janka (41) zeigen, daß eine Methotrexatinfusion von 500 mg/m^2 über 24 Stunden nicht weniger hepatotoxisch wirkt, als eine hochdosierte MTX-Therapie mit $3 - 8,5 \text{ mg/m}^2$. Inwieweit die Expositionsdauer des Lebergewebes eine Rolle bei der Entwicklung einer Hepatotoxizität spielt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Biopsische Untersuchungen von Anderson (2) zeigen in der Leber die höchsten Methotrexatkonzentrationen. Methotrexat übt ohne Zweifel einen direkten toxischen Effekt auf die Leber aus. Nach hohen Methotrexatdosen finden sich nach Chabner (12) routinemäßig akute Transaminasenerhöhungen; dieser akute Anstieg der Leberenzyme ist aber nicht sicher in Verbindung zu bringen mit der chronischen Hepatotoxizität, wie sie nach Anwendung niedriger Methotrexatdosen über einen längeren Zeitraum auftreten (12).

So berichtet Podurgiel (54) über das Auftreten hepatotoxischer Erscheinungen nach niedrigen Methotrexatdosen über einen längeren Zeitraum bei Patienten mit Psoriasis.

Freeman (22) berichtet nach mittelhochdosierter Methotrexattherapie über 24 Stunden von einem Transaminasenanstieg auf das Doppelte des Ausgangswertes bei 11/50 Zyklen. Moe und Seip (48) führten die Bestimmung der Leberenzyme nicht routinemäßig durch. Bei den Zyklen, in deren Verlauf auch die Transaminasen bestimmt wurden, beobachteten die Autoren keinen Anstieg dieser Leberenzyme (48). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu unseren Ergebnissen und auch im Widerspruch mit der oft auftretenden Hepatotoxizität bei konventionellen Methotrexatdosen (50).

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein linearer Zusammenhang zwischen der Methotrexat-Plasmakonzentration und einem Anstieg der Enzyme SGOT und SGPT gefunden werden. Untersuchungen über Mechanismen und Faktoren, die einen Einfluß auf die Höhe des Anstiegs der Leberenzyme haben, liegen in der Literatur bisher nicht vor.

5.5. Nierentoxizität

Eine Ausfällung von Methotrexat in den Nierentubuli kann zu einer erheblichen Verzögerung der Elimination dieses Medikamentes führen. Methotrexat fällt im sauren Milieu aus, seine Löslichkeit im Urin bei pH 5,7 beträgt $2,2 \times 10^{-3}$ mol/l (64). Besonders bei hochdosierter Methotrexattherapie mit Dosen von mehreren Gramm muß mit Ausfällungen im Tubulussystem gerechnet werden (53). Untersuchungen von Janka (41) machen diesen Mechanismus als Ursache einer Nephrotoxizität bei der mittelhochdosierten Methotrexattherapie wenig wahrscheinlich; nach Infusion von 500 mg/m^2 MTX über 24 Stunden lag die Methotrexatkonzentration im Urin sowohl bei Patienten mit ALL in Remission als auch bei Patienten mit ALL im Rezidiv deutlich unter $2,2 \times 10^{-3}$ mol/l.

In der vorliegenden Untersuchung erwies sich die Bestimmung des Serumkreatinins als ungeeigneter Parameter zur Vorhersage einer Nephrotoxizität von Methotrexat. Anhand unserer Ergebnisse (siehe Tab. 11 und Seite 46) läßt sich ablesen, daß bei Patienten mit ALL in Remission bei 7 % aller Zyklen falsch positive Erhöhungen des Serumkreatinins auftraten; bei Patienten mit ALL im Rezidiv betrug der Anteil falsch positiver Werte 8 %. Andererseits wiesen Patienten, die aufgrund einer verzögerten MTX-Ausscheidung teilweise schwerste toxische Erscheinungen zeigten, keine Erhöhung des Serumkreatinins auf.

Wir schließen uns der Auffassung von Stoller (65) an, der einen Kreatininanstieg im Serum über 50 % des Ausgangswertes als ungeeigneten Parameter zur Vorhersage einer Nephrotoxizität von MTX ansieht.

Die Niere gehört zu den Geweben, die mit die höchste Methotrexatkonzentration aufweisen (2). Bereits bei einer Methotrexatdosis von 30

mg/m² wurde eine akute renale Toxizität beschrieben (14), die sich pathologisch-anatomisch in Form von Tubulusepithelnekrosen manifestiert.

Bei unseren Patienten war eine Nierenfunktionsstörung vor Therapiebeginn, die zu einer Nephrotoxizität hätte führen können, in keinem Fall bekannt. Ebenso wenig können in unserem Patientengut mangelnde Alkalinisierung oder unzureichende Diurese für das Auftreten nephrotoxischer Erscheinungen verantwortlich gemacht werden. Bei unseren Patienten waren die Ausgangswerte der endogenen Kreatininclearance normal, ebenso wurde eine ausreichende Alaklinisierung und Diurese in jedem Behandlungszyklus durchgeführt. Trotz dieser Maßnahmen ließ sich die Nephrotoxizität des Methotrexat nicht in allen Fällen vermeiden. Welche zusätzlichen Mechanismen die Nephrotoxizität im Einzelfall bedingen, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß kein Zusammenhang zwischen der Serumkreatininkonzentration und der Methotrexat-Plasmakonzentration bestand und daß sich die Bestimmung der Serumkreatininkonzentration nicht als geeignetes Kriterium zur Vorhersage einer verzögerten MTX-Elimination und einer drohenden Toxizität erwies.

5.6. Zeitpunkt, Dosis und Dauer der Leukovorintherapie

Ohne Leukovorintherapie zur Folatsubstitution sollen normale Zellen nicht länger als 42 Stunden toxischen Methotrexatkonzentrationen ausgesetzt sein (44). Der Zeitpunkt der Leukovoringabe sollte dabei so gewählt werden, daß diese Expositionsdauer nicht überschritten wird.

Experimentelle Versuche von Goldin und Mitarbeiter (25) an L-1210 oder AK-4 Leukämiezellen der Maus zeigten, daß die gleichzeitige Gabe von MTX und Leukovorin sowohl auf Normalgewebe als auch auf Tumorzellen einen Schutzeffekt ausübt und somit kein therapeutischer Erfolg eintritt. In Folgeuntersuchungen konnte die gleiche Autorengruppe zeigen, daß die Leukovoringabe 12 oder 24 Stunden nach Methotrexatanwendung

deutlich bessere Therapieerfolge brachte; es konnten höhere MTX-Dosen angewendet werden und der antitumoröse Effekt von MTX wurde nicht beeinträchtigt, während für normale Gewebe eine Schutzwirkung durch Leukovorin gegeben war (26; 27; 28).

Unter genügend hohen Leukovorinkonzentrationen tritt eine vollständige Normalisierung der DNA-Synthese ein. Das ist nach Untersuchungen von Bertino (4), sowie Sauer und Schalhorn (58) dann der Fall, wenn die Leukovorinkonzentration die Methotrexatkonzentration um das Zehnfache übersteigt. Bei der üblichen Leukovorindosierung von 15 mg oral oder intramuskulär alle 6 Stunden werden für die 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure Plasmakonzentrationen von $0,6 \times 10^{-6}$ mol/l gemessen (47). Damit ist Leukovorin in einer Dosierung von 15 mg erst bei einer MTX-Plasmakonzentration von 2×10^{-7} mol/l wirksam. Unseren Untersuchungen zufolge ist das etwa 24 Stunden nach Therapieende der Fall. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde im weiteren Verlauf unserer Erhebungen auf eine Leukovoringabe 12 Stunden nach Therapieende verzichtet und die "Rescue"-Behandlung mit 15 mg Leukovorin erst 24 Stunden nach Therapieende begonnen.

Die Gabe einer einzigen Leukovorindosis 24 Stunden nach Ende einer mittelhochdosierten Methotrexattherapie bei Patienten mit ALL in Remission, wie von Freeman (21) vorgeschlagen wurde, erschien uns nicht ausreichend. Unseren Messungen zufolge betrug die Methotrexat-Plasmakonzentration bei diesen Patienten 72 Stunden nach Therapieende im Mittel noch $6,8 \times 10^{-8}$ mol/l (Tab. 2); eine Leukovorinkonzentration über 10^{-7} mol/l kann zudem nur über einen Zeitraum von etwa 6 Stunden erwartet werden (47). Deshalb entschlossen wir uns zu einer zweiten Leukovorindosis von 15 mg 6 Stunden nach Gabe der ersten Dosis.

Moe und Seip (48), die ihre Patienten mit dem Therapieschema von Freeman behandelten, berichteten über schwere toxische Erscheinungen in Form von Stomatitis, Panzytopenie und teilweise exfoliativ verlaufenden Hautexanthenen bei einer Dosis Leukovorin. Im Verlauf ihrer weiteren Untersuchungen gaben die Autoren dann zwei Dosen Leukovorin als "Rescue"-Therapie.

Auch bei der von uns vorgeschlagenen "Rescue"-Therapie mit zwei Leukovorindosen zu 15 mg muß bei 23 % aller Zyklen bei Patienten mit ALL in Remission nach einer mittelhochdosierten Methotrexattherapie mit einer hämatologischen Toxizität gerechnet werden (Tab. 8); aufgrund ihrer schnellen Reversibilität ist diese Toxizität jedoch akzeptabel.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei Patienten mit ALL in Remission nach einer 24-Stunden-Infusion von 500 mg/m^2 MTX die Leukovorinbehandlung 24 Stunden nach Infusionsende beginnen soll. Eine Dosis von 15 mg ist ausreichend, da die Methotrexat-Plasmakonzentration zu diesem Zeitpunkt im Mittel bei $1,9 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ lag und ein Wert von $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ nicht überschritten wurde. Die mit dieser Dosis erreichten Plasmaspiegel der 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure betragen das 10-fache der MTX-Konzentration zu diesem Zeitpunkt und sind damit in der Lage, die Methotrexatwirkung aufzuheben. Da wirksame Konzentrationen der 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure nur über etwa 6 Stunden bestehen, empfehlen wir eine zweite Leukovorindosis von 15 mg 6 Stunden nach der ersten Gabe, um schwere toxische Erscheinungen zu vermeiden.

Für eine Methotrexatdosis von 700 mg/m^2 können die gleichen Aussagen gemacht werden, da hier die Pharmakokinetik nicht unterschiedlich ist (Abb. 11).

Bei Patienten mit ALL im Rezidiv war eine verzögerte Methotrexatausscheidung mit schwerer hämatologischer Toxizität verbunden. Es spielte keine Rolle, ob die Leukovorintherapie 12 Stunden nach Therapieende mit 6 Dosen zu je 15 mg durchgeführt wurde, oder 24 Stunden nach Therapieende mit 2 Dosen zu 15 mg. Eine Aufhebung der Methotrexatwirkung ist bei beiden Verfahrensweisen nur innerhalb der Zeitspanne der Leukovoringabe zu erwarten, also höchstens bis zu 42 Stunden nach Therapieende.

Die Wirkungslosigkeit der Leukovorin-Schutztherapie erklärt sich nun daraus, daß bei einer verzögerten Methotrexatelimination zum Teil noch 216 Stunden (9 Tage) nach Beendigung einer 24-Stunden-Infusion von 500 mg/m^2 MTX-Plasmakonzentrationen dieses Medikamentes nachweisbar waren, die über der gewebetoxischen Schwelle von $2 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ lagen.

Weiterhin besteht Grund zu der Annahme, daß bei Patienten mit ALL im Rezidiv, die 24 Stunden nach Therapieende eine hohe MTX-Plasmakonzentration aufweisen, eine Leukovorindosis von 15 mg nicht ausreicht, da mit dieser Dosierung die für einen wirksamen "Rescue"-Effekt notwendige 10-fach höhere molare Leukovorinkonzentration im Verhältnis zur Methotrexat-Plasmakonzentration nicht erreicht wurde. Bei Rezidivpatienten kommt also sowohl der Dauer der Leukovoringabe als auch der Dosishöhe entscheidende Bedeutung zu.

Eine generelle Verlängerung der Leukovorintherapie ist unserer Meinung nach nicht unproblematisch, da eine eventuelle Schutzwirkung auf die Tumorzellen nicht ausgeschlossen werden kann. Treten toxische Erscheinungen mehrere Tage nach Infusionsende auf, ist eine erneute Leukovoringabe zwecklos, da die entscheidende Expositionsdauer für Normalgewebe dann weit überschritten ist. Aus diesen Ausführungen wird deutlich, daß die Meßergebnisse der Methotrexat-Plasmakonzentrationen rechtzeitig vorliegen müssen, um dann im Einzelfall über eine Verlängerung der Leukovorintherapie entscheiden zu können.

Liegen bei Patienten mit ALL im Rezidiv die Methotrexatspiegel 24 Stunden nach Infusionsende über einem Grenzwert von $5,0 \times 10^{-7}$ mol/l, so wird eine Steigerung der Leukovorindosis nötig. Bei anhaltend hohen MTX-Serumspiegeln können die erforderlichen hohen Leukovorindosen möglicherweise einen "Rescue"-Effekt in den Tumorzellen verursachen (19). Die Tatsache, daß für eine effektive "Rescue" Leukovorin in 10-fach höherer molarer Konzentration vorliegen muß, ermöglichte es Sauer und Schalhorn, eine Formel zur Berechnung der Leukovorindosis bei verzögerter MTX-Ausscheidung anzugeben (58).

Zusammenfassend schlagen wir aufgrund unserer Meßergebnisse bei Patienten mit ALL im Rezidiv folgendes Verfahren vor: Die Höhe der Leukovorindosis und die Dauer der Leukovoringabe soll individuell durch die Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentration festgelegt werden. Die Messungen sollen im Abstand von 24 Stunden ausgeführt werden. Leukovorin soll in der entsprechenden Dosierung solange gegeben werden, bis eine Methotrexat-Plasmakonzentration von 5×10^{-8} mol/l erreicht ist (41).

5.7. Klinische Ergebnisse

5.7.1. Patienten mit ALL im Rezidiv

Die Anwendung von Methotrexat in Form einer Monotherapie mit 500 mg/m^2 über 24 Stunden bei 8 Rezidivpatienten führte nur bei einem Patienten zu einer Teilremission des Knochenmarks (42) obwohl in allen Fällen die leukämischen Blasten aus dem peripheren Blutbild verschwanden. Hryniuk und Bertino (37) beobachteten ebenfalls eine höhere Empfindlichkeit leukämischer Blasten im peripheren Blutbild. Alle 8 Patienten hatten Methotrexat oral oder intravenös, teilweise auch intrathekal über einen langen Zeitraum erhalten. Möglicherweise war diese langdauernde Behandlung Ursache für den insgesamt enttäuschenden Behandlungserfolg der Monotherapie. Es wäre denkbar, daß im Verlauf einer intensiven Methotrexattherapie über eine entsprechend lange Zeitspanne zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber Methotrexat kommt (Übersicht bei 5). Andererseits untermauert das Verschwinden der Leukämieblasten aus dem peripheren Blutbild bei diesen Patienten die These, daß längerdauernde Methotrexatinfusionen in höherer Dosierung bei einer Resistenz gegen Methotrexat wirksam sind.

Bei weiteren 7 Rezidivpatienten wurden 3 komplette und 2 partielle Remissionen erreicht, wenn 24 Stunden nach einer Methotrexatinfusion von 500 mg/m^2 10.000 I.E./m^2 Asparaginase gegeben wurde. Diese Remissionsrate spricht für eine Überlegenheit dieser Kombination gegenüber einer Monotherapie mit Methotrexat.

Eine Interaktion zwischen Methotrexat und Asparaginase führt wahrscheinlich zu einer Synchronisation der Leukämiezellen (10); weiterhin ist die Toxizität der Kombination Methotrexat - Asparaginase auf normales Gewebe weniger ausgeprägt als die Toxizität bei alleiniger Methotrexatgabe. Dieses wurde darauf zurückgeführt, daß normale Zellen aufgrund ihrer schnelleren Passagezeit im Vergleich zu leukämischen Zellen bei Methotrexatgabe das DNA-Synthesestadium bereits passiert haben (10).

5.7.2. Remissionspatienten

Bei einer mittelhochdosierten Methotrexattherapie mit 150 mg/m^2 , wie sie in der Studie ALL 77-01 (Abb. 3) nach Erreichen der Remission zur Anwendung kam, betrug für Patienten mit Standardrisiko (Leukozyten unter $25.000/\text{mm}^3$ bei Diagnosestellung) die Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden Erstremission nach 36 Monaten über 70 % (33). Dieses Ergebnis bestätigt, daß heute mehr als 50 % aller Kinder mit ALL die Chance einer jahrelangen Erstremission haben (57).

Die Autoren der Studie ALL 77-01 wiesen darauf hin, daß eine wirksame Therapie für Leukämiepatienten mit erhöhtem Risiko (Leukozytenzahl über $25.000/\text{mm}^3$ bei Diagnosestellung und/oder reine T-Zell-Marker) durch anders geartete Behandlungsschemata erwartet werden kann (33). Ein solches Therapieschema liegt in Form des Protokolls ALL 77-02 vor (34). Dieses Protokoll kam sowohl bei Patienten mit Standardrisiko, als auch bei Patienten mit erhöhtem Risiko zur Anwendung (siehe Abb. 4 sowie Seite 15).

Für Patienten mit Standardrisiko (Leukozytenzahl unter $25.000/\text{mm}^3$ bei Diagnosestellung) betrug in der Studie ALL 77-02 die Remissionswahrscheinlichkeit nach 2 1/2 Jahren 98 % und für die Gesamtgruppe immerhin 90 % gegenüber 68 % der Studie ALL 77-01. Gegenüber dem Protokoll ALL 77-01 wurde im Protokoll 77-02 für Patienten mit Standardrisiko nur der Methotrexatblock der Intensivphase geändert (Abb. 4 und 5). Somit war ein Vergleich der Remissionswahrscheinlichkeit beider Gruppen zulässig, um den Wert der intensivierten Methotrexattherapie zu beurteilen. Bei der Studie ALL 77-02 lag das Remissionsniveau mit 98 % deutlich höher als in der Studie ALL 77-01 zum gleichen Zeitpunkt (33; 34). Die bisherigen Ergebnisse des Protokolls ALL 77-02 sprechen für die hohe Effektivität einer mittelhochdosierten Methotrexattherapie in Kombination mit Asparaginase bei der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie.

Für Patienten mit erhöhtem Risiko (Leukozyten über $25.000/\text{mm}^3$ bei Diagnosestellung, Vorhandensein von Oberflächenmarkern, undifferenzierte Leukämie) wurde in der Intensivphase des Protokolls ALL 77-02 neben

dem Methotrexatblock auch der Cytosin-Arabinosinblock gegenüber dem Protokoll ALL 77-01 geändert (Abb 4). Ein Vergleich der Remissionswahrscheinlichkeiten beider Studien aufgrund einer intensivierten MTX-Therapie ist damit für Patienten mit erhöhtem Risiko nicht mehr ohne weiteres möglich und zulässig. Dennoch erbrachte die Studie ALL 77-02 einige bemerkenswerte Ergebnisse für Hochrisikopatienten, die diskutiert werden sollten.

Für Patienten mit erhöhtem Risiko betrug die Remissionswahrscheinlichkeit nach 30 Monaten 65 %. Die weitere Analyse zeigte exzellente Resultate bei Hochrisikopatienten mit T-Zell-Oberflächenmarkern. Die Remissionswahrscheinlichkeit nach 30 Monaten betrug 85 % gegenüber 28 % in der Studie ALL 77-01. Demgegenüber sprachen Patienten mit hohen Leukozytenzahlen bei Diagnosestellung (über $25.000/\text{mm}^3$) verhältnismäßig schlecht auf die Therapie an. Dies bestätigt die Ergebnisse von Sallan (56), der hohe Leukozytenzahlen ebenfalls als schlechtes prognostisches Zeichen wertet. Die Leukozytenzahl bei Diagnosestellung dürfte mit einer der entscheidenden Parameter für die Prognose der akuten lymphatischen Leukämie nach einer mittelhochdosierten Methotrexatbehandlung entsprechend dem Therapieprotokoll ALL 77-02 sein.

Unbestritten ist zur Zeit der Stellenwert der prophylaktischen Schädelbestrahlung zur Verhütung eines Befalles des Zentralnervensystems bei ALL. Beim Vergleich dreier Methoden zur ZNS-Therapie fanden Green und Mitarbeiter (31) statistisch weniger ZNS-Befälle, wenn eine Schädelbestrahlung durchgeführt wurde. Bei unseren Patienten wurde im Protokoll ALL 77-02 die Strahlendosis bei Standardrisikopatienten aufgrund der Erfahrungen von Nesbit (51) von 2.400 rad auf 1.800 rad gesenkt; für Patienten mit erhöhtem Risiko wurde eine Strahlendosis von 2.400 rad beibehalten. Die Ergebnisse der Studie ALL 77-02 bestätigen das Konzept einer Kombination von Schädelbestrahlung und mittelhochdosierter Methotrexattherapie auf eindrucksvolle Weise (34). Ein Vergleich mit einer Studie des Roswell Park Memorial Institute, in der MTX mittelhochdosiert ohne Schädelbestrahlung gegeben wurde zeigt, daß ohne Schädelbestrahlung die Rate des ZNS-Befalles deutlich erhöht ist, und zwar sowohl für Patienten mit Standardrisiko als auch für Patienten mit erhöhtem Risiko (61). Weiterhin konnte die mehrmalige Gabe von

mittelhochdosiertem MTX die Inzidenz eines ZNS-Befalles ohne Schädelbestrahlung nicht verringern (32).

Unsere bisher vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Dauer einer hämatologischen Remission durch eine intensive mittelhochdosierte MTX-Therapie für alle Patientengruppen verbessert werden kann und daß die Anwendung von Methotrexat und Strahlentherapie eine wirksame Maßnahme zur Verhütung einer ZNS-Leukämie darstellt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

57 Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie in Remission oder im Rezidiv wurden in 153 Therapiezyklen mit mittelhochdosiertem Methotrexat in einer Dosierung von 150 mg/m^2 bzw. 500 mg/m^2 als Infusion über 24 Stunden behandelt. Es wurde ein Normbereich der Methotrexat-Plasmakonzentration für diese Dosierungen für einen Zeitraum von 12 bis 72 Stunden nach Infusionsbeginn angegeben und in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik die Toxizität des Methotrexat untersucht.

Bei 92 Behandlungszyklen (500 mg/m^2), die an 31 Patienten mit ALL in Remission durchgeführt wurden, betrug die Methotrexat-Plasmakonzentration 24 Stunden nach Infusionsende maximal $5 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$. Bei 21 Zyklen trat eine milde, rasch reversible hämatologische Toxizität auf.

Hingegen war nach 8 von 44 Infusionen bei Patienten mit ALL im Rezidiv (Dosis 500 mg/m^2) die Methotrexatausscheidung verzögert. Bei MTX-Plasmakonzentrationen zwischen $7,3 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ und $6,8 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ 24 Stunden nach Infusionsende traten bei 5 Patienten schwere, teilweise lebensbedrohliche toxische Komplikationen auf. Knochenmarkstoxische MTX-Konzentrationen wurden z. T. noch 9 Tage nach Infusionsende gemessen. Bei Patienten mit ALL im Rezidiv muß folglich mit einer veränderten Pharmakokinetik des Methotrexat gerechnet werden und die "Leukovorin-Rescue" entsprechend angepaßt werden.

Bei 6 Patienten mit Medulloblastom wurden 26 Behandlungszyklen mit einer MTX-Dosis von 700 mg/m^2 als Infusion über 24 Stunden durchgeführt. Zu keinem Zeitpunkt war ein statistisch signifikanter Unterschied der Methotrexat-Plasmakonzentration im Vergleich zu den mit einer Dosis von 500 mg/m^2 erreichten Methotrexatspiegeln feststellbar. Die Methotrexat-Liquorkonzentrationen lagen bei einer MTX-Dosis von 700 mg/m^2 nur bei einem Drittel der Patienten über der angestrebten Konzentration von 10^{-6} mol/l .

An Ende einer 24-Stunden-Infusion mit 150 mg/m^2 oder 500 mg/m^2 MTX fanden sich im Liquor 1 % - 11 % der Methotrexat-Plasmakonzentration;

in keinem einzigen Fall wurde eine therapeutische MTX-Liquorkonzentration von 10^{-6} mol/l erreicht.

Im Gegensatz dazu wurden bei Leukämiepatienten mit Befall des Zentralnervensystems MTX-Liquorkonzentrationen gemessen, die bei 5 von 21 Infusionen mehr als 10 % der MTX-Plasmakonzentration betrug; in 2 weiteren Fällen überstieg die MTX-Liquorkonzentration die MTX-Plasmakonzentration um das 2,5-fache, bzw. das 2,7-fache.

Die Erhöhung der Leberenzyme SGOT und SGPT erwies sich nicht als geeignetes Kriterium zur Objektivierung einer verzögerten Ausscheidung und damit drohenden Toxizität des Methotrexat. Ebenso konnte der Anstieg des Serumkreatinins nicht zur Bestimmung der Methotrexattoxizität herangezogen werden.

Einzig und allein die Bestimmung der Methotrexat-Plasmaspiegel erlaubt eine rechtzeitige Erfassung einer verzögerten Elimination und drohender toxischen Erscheinungen des Methotrexat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß bei MTX-Plasmakonzentrationen über $5,0 \times 10^{-7}$ mol/l 24 Stunden nach einer mittelhochdosierten MTX-Behandlung mit verzögerter Ausscheidung und teilweise schweren toxischen Erscheinungen gerechnet werden muß. Dies trifft insbesondere für Patienten mit ALL im Rezidiv zu; auf die Messung der MTX-Plasmaspiegel bei diesen Patienten kann somit nicht verzichtet werden, um rechtzeitig Gegenmaßnahmen ergreifen zu können.

Das Protokoll ALL 77-02, das für die Phase der Intensivbehandlung eine mittelhochdosierte Methotrexatbehandlung vorschreibt, hat sich durch eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit anderen Studien als überlegen erwiesen.

Es bedarf jedoch weiterer Anstrengung zur Verbesserung der Prognose bei Patienten mit Leukozytenzahlen über $25.000/\text{mm}^3$ bei Diagnosestellung, bzw. akuter undifferenzierter Leukämie.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Acute Leukemia Group B: Studies of sequential and combination antimetabolite therapy in acute leukemia: 6-mercaptopurine and methotrexate.
Blood 18: 431 - 454 (1961)
- 2 Anderson L. L., Collins G. J., Oijma Y., Sullivan R. D.: A study of the distribution of methotrexate in human tissues and tumors.
Cancer Res. 30: 1344 - 1348 (1970)
- 3 Bender R. A.: Anti-folate resistance in leukemia: treatment with "highdose" methotrexate and citrovorumfactor.
Cancer treat Rev. 2: 215 - 244 (1975)
- 4 Bertino J. R.: Rescue-techniques in cancer chemotherapy. Use of leukovorin and other rescue agents after methotrexate treatment.
Semin. Oncol. 4: 203 - 216 (1977)
- 5 Bertino J. R., Dolnick B. J., Berenson R. J., Scheer D. J., Kamen B. A.: Cellular mechanisms of resistance to methotrexate.
In: Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents.
385 - 397, Academic Press (1981)
- 6 Bleyer W. A., Drake J. C., Chabner B. A.: Neurotoxicity and elevated cerebrospinal-fluid methotrexate concentration in meningeal leukemia.
N. Engl. J. Med. 289: 770 - 773 (1973)
- 7 Bleyer W. A.: Methotrexate: clinical pharmacology, current status and therapeutic guidelines.
Cancer Treat. Rev. 4: 87 - 101 (1977)
- 8 Bleyer W. A.: The clinical pharmacology of methotrexate.
Cancer 41: 36 - 51 (1978)
- 9 Bloom H. J. G.: Results of the SIOP Medulloblastoma: ependymoma trial 11th Meeting of the SIOP, Lisbon (1979)
- 10 Capizzi R. L.: Improvement in the therapeutic index of methotrexate (NSC-740) by L-asparaginase (NSC-109 229).
Cancer Chemother. Rep. 59: 37 - 41 (1975)

- 11 Chabner B. A., Young R. C.: Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumor target tissues.
J. Clin. Invest. 52: 1804 - 1811 (1973)
- 12 Chabner B. A., Meyers C. E., Coleman C. N., Johns D. G.: The clinical pharmacology of antineoplastic agents.
N. Engl. J. Med. 292: 1107 - 1113 (1975)
- 13 Condit P. T., Eliel L. P.: Effects of large infrequent doses of amethopterin on acute leukemia in children.
J. Am. Med. Ass. 172: 451 - 453 (1960)
- 14 Condit P. T., Chanes R. E., Joel W.: Renal toxicity of methotrexate.
Cancer 23: 126 - 131 (1969)
- 15 Djerassi I., Abir E., Roger G. L. Jr.: Longterm remission in childhood acute leukemia: use of infrequent infusions of methotrexate; supportive rate of platelet transfusions and citrovorum factor.
Clin. Pediatr. 5: 502 - 509 (1966)
- 16 Djerassi I., Farber S., Abir E., Neikirk W.: Continuous infusions of methotrexate in children with acute leukemia.
Cancer 20: 233 - 242 (1967)
- 17 Djerassi I.: Methotrexate infusions and intensive supportive care in the management of children with acute leukemia: Follow-up Report.
Cancer Res. 27: 2561 - 2564 (1967)
- 18 Djerassi I., Kim J. S., Nayak N. P., Ohanissian H., Adler S.: High-dose methotrexate with citrovorum factor rescue: a new approach to cancer chemotherapy.
In: Recent Advances in Cancer Treatment, Vol. 3 (201 - 225); H.J. Tagnon and M.J. Staquet Eds., New York Raven Press (1972)
- 19 Djerassi I., Kim J. S., Nyak N. P., Ohanissian H., Adler S., Hsieh S.: New "rescue" with massive doses of citrovorum factor to potentially lethal methotrexate toxicity.
Cancer Treat. Rep. 61: 749 - 750 (1977)

- 20 Farber S., Diamond L. K., Mercer R. D., Sylvester R. F. Jr., Wolff J. A.: Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist 4-amino-pteroyl-glutamic-acid (aminopterin).
N. Engl. J. Med. 238: 787 - 793 (1948)
- 21 Freeman A. I., Wang J. J., Sinks L. F.: High-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia.
Cancer Treat. Rep. 61: 727 - 731 (1977)
- 22 Freeman A. I., Brecher M. L., Wang J. J., Sinks L. F.: Intermediate dose methotrexate (IDM) in childhood acute lymphocytic leukemia.
Haematol. Bluttransfus. 23: 115 - 123 (1979)
- 23 Frei E., Jaffe N., Tattersall M. H. N., Pitman S., Parker L.: New approaches to cancer chemotherapy with methotrexate.
N. Eng. Med. 292: 846 - 851 (1975)
- 24 Goldie J. H., Price L. A., Harrap K. R.: Methotrexate toxicity: Correlation with duration of administration, plasma levels, dose and excretion pattern.
Eur. J. Cancer 8: 409 - 414 (1972)
- 25 Goldin A., Mantel N., Greenhouse S. W., Venditti J. M., Humphreys S. R.: Estimation of the antileukemia potency of the antimetabolite aminopterin administered alone and in combination with citrovorum factor or folinic acid.
Cancer Res. 13: 843 - 850 (1953)
- 26 Goldin A., Mantel N., Greenhouse S. W.: Effect of delayed administration of citrovorum factor on the antileukemic effectiveness of aminopterin in mice.
Cancer Res. 14: 43 - 48 (1954)
- 27 Goldin A., Venditti J. M., Humphreys S. R.: Factors influencing the specificity of action of an antileukemic agent (aminopterin). Multiple treatment schedules plus delayed administration of citrovorum factor.
Cancer Res. 14: 57 - 61 (1955)
- 28 Goldin A., Venditti J. M., Kline J., Mantel N.: Eradication of leukemic cells (L 1210) by methotrexate and methotrexate plus citrovorum factor.
Nature 212: 1548 - 1550 (1966)

- 29 Goldman I. D.: Membrane transport of methotrexate (NSC-740) and other folate compounds: relevance to rescue protocols.
Cancer Chemother. Rep. 59: 63 - 72 (1975)
- 30 Goldman I. D.: Effects of methotrexate on cellular metabolism: Some critical elements in the drug-cell interaction.
Cancer Treat. Rep. 61: 549 - 558 (1977)
- 31 Green D. M., Freeman A. J., Sather H. M., Sallan S. E., Nesbit M. E. Jr., Cassady J. R., Sinks L. F., Hammond D., Frei E. III: Comparison of three methods of central-nervous-system prophylaxis in childhood acute lymphoblastic leukemia.
Lancet I: 1398 - 1402 (1980)
- 32 Green D. M., Brecher M. L., Blumenson L. E., Grossi M., Freeman A. J.: The use of intermediate dose methotrexate in increased risk childhood acute lymphoblastic leukemia.
Cancer 50: 2711 - 2727 (1982)
- 33 Haas R. J., Janka G. E., Netzel B., Helmig M.: Muenchner Studie zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukaemie im Kindesalter (All 77-01).
Klin. Paediatr. 193: 17 - 27 (1981)
- 34 Haas R. J., Janka G. E., Gaedicke G., Hohne E., Netzel B.: Therapy of acute lymphocytic leukemia in childhood with intermediate dose methotrexate and CNS-irradiation.
A report of the ALL 77-02 study group.
Blut 47: 321 - 331 (1983)
- 35 Henderson E. S., Adamson R. H., Oliveira V. T.: The metabolic fate of tritiated methotrexate II. Absorption and excretion in man.
Cancer Res. 25: 1018 - 1024 (1965)
- 36 Hoffbrand A. V., Tripp E.: Unbalanced deoxyribo-nucleotide synthesis caused by methotrexate.
Br. Med. J. 2: 140 - 142 (1972)
- 37 Hryniuk W. M., Bertino J. R.: Treatment of leukemia with large doses of methotrexate and folinic acid: clinical-biochemical correlates.
J. Clin. Invest. 48: 2140 - 2155 (1969)

- 38 Huffman D. H., Wan S. H., Azarnoff D. L., Hoogstraten B.: Pharmacokinetics of methotrexate.
Clin. Pharmacol. Ther. 14: 572 - 579 (1973)
- 39 Intern. Society of Paed. Oncology: Trial of adjuvant chemotherapy in children with medulloblastoma and high-grade intracerebral ependymoma.
Protocol London (1975)
- 40 Jacobi H.: Chemotherapie kindlicher Hirntumoren.
Zeitschrift fuer Allgemeinmedizin 25: 1092 - 1096 (1974)
- 41 Janka G. E.: Hochdosierte und mittelhochdosierte Methotrexattherapie bei Kindern mit Leukaemie und soliden Tumoren: Bedeutung der Bestimmung von Blut- und Liquorkonzentration für die Verlaufskontrolle.
Habilitationsschrift, München (1982)
- 42 Janka G. E., Mack R., Helmig M., Haas R. J., Bidlingmaier F.: Prolonged methotrexate infusions in children with leukemia in relapse and in remission and with medulloblastoma - pharmacokinetics, toxicity and clinical results.
Oncology 41: 225 - 232 (1984)
- 43 Kessel D., Hall T. C., Roberts D.: Modes of uptake of methotrexate by normal and leukemic human leukocytes in vitro and their relation to drug response.
Cancer Res. 28: 564 - 570 (1968)
- 44 Levitt M., Mosher M. B., De Conti R. C., Farber L. R., Skeel R. T., Marsh J. C., Mitchell M. S., Papac R. J., Thomas E. D., Bertino J. R.: Improved therapeutic index of methotrexate with "leucovorin-rescue".
Cancer Res. 33: 1728 - 1734 (1973)
- 45 Liegler D. G., Henderson E. S., Hahn M. A., Oliveiro V. T.: The effects of organic acids on renal clearance of methotrexate in man.
Clin. Pharmacol. Ther. 10: 849 - 857 (1969)
- 46 Loeffler L. J., Blum M. R., Nelsen M. A.: A radioimmunoassay for methotrexate and its comparison with spectrofluorimetric procedures.
Cancer Res. 36: 3306 - 3311 (1976)

- 47 Mehta B. M., Gisolfi A. L., Hutchinson D. J., Nirenberg A., Kellick M. G., Rosen G.: Serum distribution of citrovorum factor and 5-methyl-tetrahydrofolate following oral and i. m. administration of calcium leucovorin in normal adults.
Cancer Treat. Rep. 62: 345 - 350 (1978)
- 48 Moe P. J., Seip M.: High-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia in childhood.
Acta Paediatr. Scand. 67: 265 - 268 (1978)
- 49 Neidhardt M.: Möglichkeiten der Chemotherapie bei Hirntumoren im Kindesalter.
Therapie der Gegenwart 8: 1273 - 1285 (1974)
- 50 Nesbit M., Krivit W., Heyn R., Sharp H.: Acute and chronic effects of methotrexate on hepatic, pulmonary and skeletal systems.
Cancer 37: 1048 - 1054 (1976)
- 51 Nesbit M. E. Jr.: Presymptomatic central-nervous-system therapy in previously untreated childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison of 1800 rad. and 2400 rad.
Lancet I: 461 - 466 (1981)
- 52 Pinedo H. M., Chabner B. A.: Role of drug concentration, duration of exposure and endogenous metabolites in determining methotrexate cytotoxicity.
Cancer Treat. Rep. 61: 709 - 715 (1977)
- 53 Pitman S. W., Parker L. M., Tattersall M. H. N., Jaffe N., Frei E. III: Clinical trials of high-dose methotrexate (NSC-740) with citrovorum factor (NSC-3590) - toxicologic and therapeutic observations.
Cancer Chemother. Rep. 59: 43 - 49 (1975)
- 54 Podurgiel B. J., Mc Gill D. B., Ludwig J., Taylor W. F., Miller S. D.: Liver injury associated with methotrexate therapy for psoriasis.
Mayo Clin. Proc. 48: 787 - 792 (1973)
- 55 Rechnitzer C., Scheibel E., Hendel J.: Methotrexate in the plasma and cerebrospinal fluid of children treated with intermediate dose methotrexate.
Acta Paediatr. Scand. 70: 615 - 618 (1981)

- 56 Sallan S. E., Ritz J., Resando J. et al.: Cell surface antigens: Prognostic implications in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 55: 396 (1980)
- 57 Sallan S. E., Weinstein H. J., Nathan D. G.: The childhood leukemias. J. Paediatr. 99: 676 - 688 (1981)
- 58 Sauer H. J., Schalhorn A.: Rationale Grundlagen und Praxis des Citrovorumfaktor (Leukovorin)-Schutzes nach hochdosierter Methotrexattherapie. Onkologie 3: 64 - 71 (1980)
- 59 Selawry O. S.: New treatment schedule with improved survival in childhood leukemia: intermittent parenteral vs. daily oral administration of methotrexate for maintenance of induced remission. J. Am. Med. Ass. 194: 75 - 81 (1965)
- 60 Shapiro W. R., Young D. F., Mehta B. M.: Methotrexate: distribution in cerebrospinal fluid after intravenous, ventricular and lumbar injection. N. Engl. J. Med. 293: 161 - 166 (1975)
- 61 Sinks L. F., Wang J. J., Freeman A. J.: The treatment of primary childhood acute lymphocytic leukemia with intermediate dose methotrexate. In: Neth, Gallo, Graf, Mannweiler, Winkler (Eds.). Haematology and blood transfusion, Vol. 26. Modern trends in human leukemia IV, Springer, Berlin und Heidelberg 18 - 26 (1981)
- 62 Sostman H. D., Matthay R. A., Putman D. E., Smith G. J. W.: methotrexate induced pneumonitis. Medicine 55: 371 - 388 (1976)
- 63 Steele W. H., Lawrence J. R., Stuart J. F. B., Mc Neill C. A.: The protein binding of methotrexate by the serum of normal subjects. Eur. J. Clin. Pharmacol. 15: 363 - 366 (1979)
- 64 Stoller R. G., Jacobs S. A., Drake J. C., Lutz R. J., Chabner B. A.: Pharmacokinetics of high-dose methotrexate (NSC-740). Cancer Chemother. Rep. 59: 19 - 24 (1975)

- 65 Stoller R. G., Hande K. R., Jacobs S. A., Rosenberg S. A., Chabner B. A.: Use of plasma pharmacokinetics to predict and prevent methotrexate toxicity.
N. Engl. J. Med. 297: 630 - 634 (1977)
- 66 Tattersall M. H. N., Parker L. M., Pitman S. W., Frei E. III: Clinical pharmacology of high-dose methotrexate (NSC-740).
Cancer Chemother. rep. 59: 25 - 29 (1975)
- 67 Wan S. H., Huffmann D. H., Azarnoff D. L., Stephans R., Hoogstraten B.: Effect of route of administration and effusions of methotrexate pharmacokinetics.
Cancer Res. 34: 3487 - 3491 (1974)
- 68 Wang J. J., Freeman A. J., Sinks L. F.: Treatment of acute lymphocytic leukemia by high-dose intravenous methotrexate.
Cancer Res. 36: 1441 - 1444 (1976)
- 69 Warren R. D., Nichols A. P., Bender R. A.: Membrane transport of methotrexate in human lymphoblastoid cell lines.
Cancer Res. 38: 668 - 671 (1978)
- 70 Wiesner H.: Hochdosierte Methotrexattherapie bei osteogenem Sarkom im Kindesalter: Pharmakokinetische Untersuchungen mit einem spezifischen Radioimmunoassay.
Dissertation, Muenchen (1981)

LEBENS LAUF

- 1952: Am 24. September als erstes von fünf Geschwistern geboren.
Vater: Franz Mack, Postfacharbeiter.
Mutter: Maria Mack, geb. Schreiner, Hausfrau.
- 1959- Besuch der Volksschule in München.
1963:
- 1963- Besuch des humanistischen Zweiges des Wittelsbacher Gymnasiums
1972: in München und Ablegung des Abiturs.
- 1972: Ab 1. Oktober Grundwehrdienst.
1973: Am 31. Dezember Grundwehrdienst beendet.
- 1974: Im Sommersemester Beginn des Studiums der Physik an der
Ludwig Maximilians-Universität in München.
- 1975: Am 7. März Heirat mit Irmengard Knerr.
- 1976: Im Wintersemester auf Grund einer einstweiligen Verfügung des
VG Regensburg Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
dortigen Universität.
- 1977: Im Sommersemester endgültige Zulassung zum Studium der Human-
medizin durch die ZVS in Dortmund; Fortsetzung des Studiums an
der Ludwig Maximilians-Universität in München.
- 1982: Am 18. Mai Erteilung der Approbation als Arzt durch das Baye-
rische Staatsministerium des Innern.
- Am 15. Juni Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt der gynäko-
logisch-geburtshilflichen Abteilung des Kreiskrankenhauses
Donauwörth (Chefarzt Dr. med. Glaser).
- Am 11. Oktober Geburt der Zwillingstöchter Elisabeth und
Hildegard.
- 1984: Seit 1. April als Assistenzarzt an der Frauenklinik des Städt.
Krankenhauses Friedrichshafen (Chefarzt Prof. Dr. med.
Unbehauen) tätig.

Am Schluß der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. H. B. Hadorn für das Korreferat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. J. Haas für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Prof. em. Dr. K. Betke schulde ich Dank für die Überlassung von Räumlichkeiten in seiner Klinik zur Durchführung der notwendigen Versuchsreihen.

An dieser Stelle möchte ich Frau PD Dr. G. Janka - jetzt Universität Hamburg - für ihre Unterstützung meinen herzlichen Dank aussprechen.

Den Damen des hämatologischen Labors sowie des Stoffwechsellabors der Universitätskinderklinik München danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihr stets freundliches Entgegenkommen.

Meiner Schwester Gertraud danke ich für die Sorgfalt, mit der sie das Manuskript druckfertig gemacht hat.

Nicht vergessen möchte ich am Schluß meine Frau Irmengard, ohne deren Verständnis diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

